

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de Diciembre de 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/94932 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: G01N 27/47,
C12Q 1/68

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/CU01/00003

(22) Fecha de presentación internacional:
7 de Junio de 2001 (07.06.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
0135/00 7 de Junio de 2000 (07.06.2000) (CU)
0306/00 27 de Diciembre de 2000 (27.12.2000) (CU)

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo U.S.):
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CNIC) [CU/CU]; Avenida 25 No. 15202
Esq. A 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para U.S. solamente): RIVERÓN
ROJAS, Ana, María [CU/CU]; Calle 21 A. No. 20614
entre 206A y 214, Atabey, Playa, Ciudad de Habana 12100
(CU). LÓPEZ CÁNOVA, Lilia [CU/CU]; Calle 21 A. No.

20614 entre 206A y 214, Atabey, Playa, Ciudad de Habana 12100 (CU). ARENCIBIA DÍAZ, Oscar [CU/CU]; Calle 174 Edif. BBE-1, Apto. 6 Rto. Flores, Playa, Ciudad de Habana 12100 (CU). HERRERA ISIDRÓN, Jose, Alfredo [CU/CU]; Calle 174 Edif. BBE-2, Apto. 14, Rpto Flores, Playa, Ciudad de Habana 12100 (CU). PÉREZ PEREZ, Gabriel [CU/CU]; Calle 25, No. 868, Apto. 1 Vedado, Plaza de la Revolución, Cuba 10400 (CU). OROZCO OROZCO, Esther [MX/MX]; Vía Ceti No. 20, Fracc. Luis Enrique Erro, Planetario Lindavista, Mexico, D.F. 07000 (MX). CÁMINO RAMOS, Carlos, Alberto [CU/CU]; Calle 192, No. 1991 entre 199 y 201, María del Carmen, Boyeros, Ciudad de Habana 19200 (CU). BATISTA SANTILER, Luis Mariano [CU/CU]; Ave. 31, No. 31206 entre 312 y 316, Juan de Dios Fraga, Ciudad de Habana 17100 (CU). GIGATO PÉREZ, Regnar [CU/CU]; Calle 206, No. 1922 entre 19 y 21, Atabey, Playa, Ciudad de Habana 12100 (CU). RUÍZ ESQUIVEL, Leonardo [CU/CU]; Calle 28, No. 255, Apto. 3 entre 21 y 23, Vedado, Plaza de la Revolución, Cuba 12300 (CU). NOA BLANCO, María Dolores [CU/CU]; Calle 10, No. 125 entre 1ra y 5ta, Miramar, Playa, Ciudad de Habana 12100 (CU). JAVERT HIGGINSON, Elisa [CU/CU]; Calle 232 Edif. 14, Apto. 11, Rpto. San Agustín, La Lisa, Ciudad de Habana 13600 (CU).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PULSED FIELD ELECTROPHORESIS CHAMBERS, ACCESSORIES AND METHOD OF UTILIZATION FOR SEPARATION OF DNA MOLECULES

(54) Título: CÁMARAS DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODO DE EMPLEO PARA LA SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN

(57) Abstract: The invention relates to methods of utilization, accessories and chambers suitable for conducting pulsed field electrophoresis (PFE) of DNA molecules in the systems Contour Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF) and Transversal Alternating Field Electrophoresis (TAFE). The chambers rapidly separate the DNA molecules into minigels. The distance between the opposite polarity electrodes range from 6.2 and 15 cm, said distance determining the sizes of the chambers and accessories. The molecules are reproducibly separated since the accessories ensure homogeneous electrical resistance in the buffer and minigel. The chambers can receive high-format samples thereby efficiently using reactants. This is achieved by excluding the non-useful electrophoresis zones. For further optimization, the TAFE chambers have several useful electrophoresis zones (UEZ), each having a minigel. One or several UEZs can be activated at will in electrophoresis to change the amount of minigels, samples and buffers in-between experiments. Chambers with an "inverted TAFE configuration" having cathodes on their bottom part are shown.

(57) Resumen: Se brindan métodos de empleo, accesorios y cámaras aptos para realizar electroforesis de campos pulsantes (ECP) a moléculas de ADN en los sistemas "Contour Clamped Homogeneous Electric Field" (CHEF) y "Transversal Alternating Field Electrophoresis" (TAFE). Las cámaras separan rápidamente a moléculas de ADN en minigeles. Las distancias entre los electrodos de polaridades opuestas están comprendidas entre 6.2 y 15 cm y determinan las dimensiones de las cámaras y accesorios. Las moléculas son separadas reproduciblemente porque los accesorios garantizan resistencia eléctrica homogénea en el tampón y minigel. Las cámaras admiten alto formato de muestras usando eficientemente los reactivos. Esto se logra excluyendo las zonas no útiles de electroforesis. Par mayor optimización, las cámaras TAFE poseen varias zonas útiles de electroforesis (ZUE) con un minigel cada una. Una o varias ZUE pueden ser activadas a voluntad en la electroforesis para variar entre los experimentos la cantidad de minigeles, muestras y tampón. Se presentan cámaras en "configuración TAFE invertida" con los cátodos en su parte inferior.

WO 01/94932 A1



(74) **Mandatario:** HERRERA CABRERA, Violeta María;
Ave. 25 No. 15202 Esq. A 158, Cubanacán, Playa, Ciudad
de la Habana 12100 (CU).

(81) **Estados designados (nacional):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Estados designados (regional):** patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente

euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

CÁMARAS DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODO DE EMPLEO PARA LA SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.

DESCRIPCIÓN

5

TÍTULO DE LA INVENCION: CÁMARA DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES, ACCESORIOS Y MÉTODO DE EMPLEO PARA LA SEPARACIÓN DE MOLÉCULAS DE ADN.

10 **ÍNDICE DE LA CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES:** G01N 27/26.

La presente invención se relaciona con la rama de la Biología Molecular y en particular se refiere a cámaras de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas 'Contour Clamped Homogeneous Electric Field' y 'Transversal Alternating Field Electrophoresis' (TAFE) y sus accesorios así como a sus métodos de empleo para la separación de moléculas de ADN y un método para la selección de las condiciones de electroforesis empleando dichas cámaras.

20 **NIVEL CONOCIDO DE LA TÉCNICA. CARACTERÍSTICAS DE LAS SOLUCIONES ANÁLOGAS.**

La electroforesis de campos pulsantes (ECP) data de 1984, cuando Schwartz D.C. y Cantor C. (**Cell**, 37, 67-75, 1984; **Patente U.S. No. 4,473,452**) observaron que las grandes moléculas intactas de ADN se resolvían en los geles de agarosa en patrones de bandas mediante la aplicación de pulsos eléctricos que alternaban periódicamente su dirección de aplicación, la que formaba un cierto ángulo en relación con el gel. Los autores también determinaron que la separación de las moléculas dependía esencialmente de la duración de los pulsos eléctricos. Con posterioridad, se determinó que la geometría de las líneas de fuerza de los campos eléctricos alternantes, la intensidad de los mismos, la temperatura experimental, la fuerza iónica de la solución tampón y la concentración del gel de agarosa eran factores importantes que influían en la resolución que podía ser alcanzada entre las moléculas de ADN (**Birren B. y Lai E. Academic Press. New York, 1993, pp 107, 111, 129, 131, 135; López-Cánovas L. y**

cols., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139; López-Cánovas L. y cols., J. of Chromatogr. A, 1998, 806, 187-197).

La electroforesis de campos pulsantes brinda la separación de las moléculas de ADN en forma de patrones de bandas. Es decir cada patrón se forma después de la electroforesis en las carrileras de los geles de separación. A su vez, en cada pocillo del gel se depositan bloques de agarosa que contienen las moléculas inmovilizadas de ADN, las que durante la electroforesis migran a lo largo de dichas carrileras y forman los patrones de bandas. Por tanto, este tipo de electroforesis tiene asociado un método para preparar moléculas de ADN intactas e inmovilizadas en bloques de gel. Esas moléculas pueden ser, o no, digeridas con endonucleasas de restricción antes de sufrir el proceso de electroforesis. Se han desarrollado varios sistemas para realizar la ECP, los que se caracterizan por poseer cámaras en las cuales se colocan los electrodos en ordenamientos diferentes. Entre esas cámaras se encuentran las cámaras con ordenamiento de electrodos OFAGE (del Inglés, 'Orthogonal Field Alternating Gel Electrophoresis, Carle C.F. y Olson M.V. Nucleic Acids Res. 1984, 12, 5647-5664), CHEF ('Contour Clamped Homogeneous Electric Field', Chu G. Science 234, 1986, 1582-1585), TAFE ('Transversal Alternating Field Electrophoresis', Patente US. No. 4, 740, 283), FIGE ('Field Inversion Gel Electrophoresis', Patente US. No. 4, 737, 251 de Carle G.F. y Olson M.V) y las mini-cámaras MiniTAFE y MiniCHEF (Riverón, A.M. y cols., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844).

Todos estos sistemas se caracterizan por poseer circuitos electrónicos para alternar los campos eléctricos y por poseer accesorios para preparar el gel. También existen accesorios para preparar las muestras. Ellos se diferencian entre sí por la complejidad de la electrónica para energizar los electrodos y cambiar la orientación del campo eléctrico. También se diferencian por su capacidad, o incapacidad, de brindar trayectorias rectas de migración en los patrones de bandas. La posibilidad de obtener trayectorias rectas de migración es esencial cuando se desean comparar los patrones que brindan numerosas muestras, mientras que la sencillez en la electrónica facilita y abarata la producción de los sistemas. De los sistemas mencionados, existen tres que brindan trayectorias rectas de migración de las moléculas:

1.- El sistema CHEF, que emplea un arreglo hexagonal de electrodos donde se fijan los potenciales eléctricos en un contorno cerrado alrededor de un gel submarino colocado horizontalmente;

2.- El sistema TAFE, en el cual se realiza la electroforesis en geles submarinos que se colocan verticales en la cámara y emplea campos alternantes transversales en relación con el gel; y

3.-El sistema FIGE, en el cual se realiza la electroforesis en geles submarinos horizontales que se colocan en cámaras convencionales de electroforesis, las que poseen dos electrodos donde se revierte periódicamente la orientación del campo eléctrico.

Estos sistemas tienen en común que en sus cámaras se coloca un gel que es atravesado simétricamente por las líneas de fuerza de los campos eléctricos que se generan en los electrodos que tienen polaridad opuesta en el ordenamiento de electrodos. En ese gel se depositan las muestras que contienen las moléculas intactas de ADN que son separadas. En todas esas cámaras también existen zonas por donde pasan líneas de fuerza del campo eléctrico que no atraviesan el gel y por tanto no actúan sobre las moléculas. La zona de la cámara que contiene el gel y por la cual pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que actúan directamente sobre las moléculas se denominará aquí zona útil de electroforesis (ZUE), mientras que las zonas de la cámara por donde pasan líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre las moléculas la denominaremos zonas no útiles de electroforesis (ZNU). Todas las cámaras existentes para realizar ECP poseen una región ZUE y regiones ZNU.

La cámara y la electrónica del sistema FIGE son sencillas y existen cámaras que permiten analizar simultáneamente numerosas muestras (**hasta 96 muestras, empleando dos peines de 48 dientes en la Cubeta OnePhorAll Submarine Gel System de la Jordan Scientific, Catálogo BDH, 1997, Sección E pp 4-371**), pero en las cámaras FIGE se observan fenómenos de inversión de la movilidad de las moléculas (**Carle G.F., Frank M. y Olson M.V. Science, vol. 232, pp 65-68, 1986**). Debido a la ausencia de teoría que prediga cuáles moléculas de ADN invertirán su movilidad bajo determinadas condiciones experimentales en el FIGE, dicha inversión limita la utilización de dichas cámaras para analizar el tamaño de las moléculas de ADN que son separadas y comparar sus patrones de bandas. Por ejemplo, ese fenómeno puede provocar que dos moléculas de ADN de tamaños diferentes migren la misma distancia en el gel, lo que impide identificarlas, salvo que se recurra a procedimientos de hibridación con sondas. Hasta el momento, las dos únicas formas de estimar el tamaño de grandes moléculas específicas de ADN separadas en experimentos de ECP son: 1) comparar la distancia que migra la molécula en estudio

con las distancias migradas por los marcadores de tallas y 2) emplear ecuaciones que describan las distancias migradas por las moléculas bajo condiciones diferentes de electroforesis y posteriormente reemplazar adecuadamente en ellas las distancias migradas y las variables experimentales. En el FIGE los marcadores de talla también
5 pueden sufrir fenómenos de inversión de la movilidad y como se mencionó no existe teoría capaz de predecir el momento y las condiciones en que una molécula invertirá su movilidad. Estas son limitaciones serias para emplear cámaras FIGE en estudios comparativos de numerosas muestras, como ocurre, por ejemplo, en la epidemiología molecular. Por esa razón, los sistemas más utilizados en la actualidad para comparar los
10 patrones de bandas de múltiples muestras son el CHEF y el TAFE.

El sistema TAFE fue propuesto por Gardiner K. y cols. en su publicación en **Somatic Cell Mol. Genet. 1986, 12, 185-195**, lo denominaron inicialmente como "Vertical Pulsed Field Electrophoresis" (VPFE) y desarrollaron un aparato que fue protegido por la **Patente U.S. No. 4, 740, 283 de abril 26 de 1988**. Ese sistema de separación de moléculas de ADN
15 consiste en colocar verticalmente un gel de 10 x 7,6 x 0,6 cm (longitud x ancho x espesor) y disponer todos los electrodos paralelamente con las caras del gel y a todo lo ancho del mismo y de la cámara. En la cámara cada miembro de un par de electrodos de polaridades opuestas se coloca frente a una de las caras del gel. El cátodo se colocó en la parte superior y cercano al origen de migración y el ánodo alejado de este, al final del
20 gel. Esta disposición de electrodos genera líneas isopotenciales a todo lo ancho del gel y un gradiente de potencial o campo eléctrico, donde las líneas de fuerza de dicho campo eléctrico atraviesan transversalmente al gel. Entonces, a lo largo del gel se obtiene un gradiente de intensidad de campo eléctrico y del ángulo que forman las líneas de fuerza de los dos pares de electrodos. Por esa razón, las moléculas son forzadas a migrar
25 durante cada pulso a través del grosor del gel. La migración resultante ocurre en dirección vertical, hacia abajo. A pesar de la existencia de esos gradientes de intensidad del campo eléctrico, todos los puntos que se ubican a lo ancho del gel y a una misma altura con relación al plano que contiene ambos cátodos o ambos ánodos están a un mismo valor de potencial eléctrico (líneas isopotenciales), por lo que las moléculas de igual tamaño
30 recorren distancias similares durante la electroforesis en todas las carrileras del gel y migran siguiendo trayectorias rectas hasta la misma altura en el gel, con independencia del pocillo en el cual fueron depositadas las muestras.

Basado en esos principios, la Beckman Instrument, Inc. (Beckman, *The Geneline System Instruction Manual*, ed. Spinco Division of Beckman Instruments, 1988) construyó el equipo denominado "Geneline I", o "Transverse Alternating Field Electrophoresis System" conocido como TAFE. Este sistema emplea un gel de 11 x 7,2 x 0,6 cm (longitud x ancho x espesor), que se coloca entre pares de electrodos opuestos que están separados 20 cm. Con posterioridad, la Beckman Instrument, Inc. desarrolló el equipo "Geneline II" en el cual el gel se agrandó hasta 14,2 x 15 x 0,3 cm. El equipo Geneline II está descontinuado en la actualidad.

Para resolver las moléculas de ADN de gran tamaño en un patrón de bandas se requiere mucho tiempo en los equipos TAFE, Geneline I y Geneline II. Por ejemplo, el Geneline I requiere 24 horas para brindar un patrón de 11 bandas de los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (moléculas menores de 1.6 Mb. 1 Mb = 10^6 pares de bases). Este mismo equipo puede necesitar hasta 90 horas para separar en 17 bandas las moléculas de ADN del genoma amibiano (Orozco E et al., *Molec. Biochem. Parasitol.* vol. 59, pp 29-40, 1993). Por otro lado, las cámaras TAFE requieren gran cantidad de la solución tampón para cubrir sus electrodos (por ejemplo, 3500 ml en la Geneline II) y durante la electroforesis la corriente es elevada y el calor que se genera puede ser grande. Si en los equipos TAFE se incrementa la diferencia de potencial aplicada entre los electrodos de polaridad opuesta se puede alcanzar el límite de corriente de la fuente de poder. Por eso, los fabricantes recomiendan que el valor máximo de campo eléctrico aplicable sea de 10 V/cm (para fuentes cuyo límite de corriente es 0.4 Amperes). Esto impide que se reduzca la duración de las electroforesis mediante incrementos en la intensidad del campo eléctrico. Se ha planteado que el uso de voltajes elevados o altas temperaturas ensanchan y hacen difusas las bandas del patrón electroforético, lo que puede provocar ausencia de resolución entre las bandas. La ventaja del Geneline II es que permite analizar simultáneamente 40 muestras, lo que facilita el análisis comparativo de los patrones electroforéticos que brindan numerosas muestras.

El sistema CHEF fue desarrollado por Gilbert Chu (*Science* 1986, 234, 16, 1582-1585) con el siguiente fundamento: un campo eléctrico homogéneo es generado teóricamente por dos electrodos infinitos colocados paralelamente a cierta distancia. Para simular un campo homogéneo con electrodos finitos, otro grupo de electrodos se colocan en el mismo plano, a lo largo de un polígono cerrado, ya sea un cuadrado o un hexágono. Se hace coincidir el eje X ($y=0$) del plano con un lado del polígono y se le aplica un potencial

de 0 Volt. El lado opuesto, a una distancia $y=A$ del origen de coordenadas, se polariza a un potencial V_0 . El resto de los electrodos se polarizan según $V(y) = V_0 \cdot y/A$. De esta forma el potencial generado en el interior del polígono es igual al que sería generado por dos electrodos infinitos paralelos separados a una distancia A . El ángulo de reorientación
5 obtenido al permutar electrónicamente la polaridad entre dos pares de lados diferentes será de 90° para el polígono cuadrado y de 60° ó 120° para el hexagonal. Un método para fijar los potenciales deseados en los electrodos del CHEF es disponer de una serie de resistencias alambradas en forma de divisor de voltaje entre los potenciales $V(0) = 0$ y $V(A) = V_0$. De cada uno de los nodos, formados por la unión de dos resistencias, se
10 obtiene el voltaje para polarizar un electrodo.

Basado en esos principios la firma BIORAD desarrolló los equipos CHEF-DR II, CHEF-DR III y CHEF Mapper (**Patente US. 4, 878, 008, Patente US. No. 5, 084, 157 y Patente US. 5, 549, 796**). Este último es el sistema más avanzado. Para la imposición de los valores de voltaje en el arreglo hexagonal de electrodos emplea un divisor de voltaje, alambrado a
15 un sistema transistorizado y amplificadores operacionales. Esa electrónica garantiza que los valores que se fijan en cada electrodo del arreglo hexagonal de la cámara sean siempre correctos.

Las dimensiones de la cámara de electroforesis del CHEF Mapper son $11,4 \times 44,2 \times 50,3$ cm (alto x ancho x profundidad), pesa 10,2 Kg y utiliza 2,2 litros de solución tampón. Este
20 sistema emplea un gel de 14×13 cm (ancho y longitud) que se coloca concéntrico con el arreglo hexagonal de 24 electrodos cuyos lados paralelos están separados a 30 cm o más. El CHEF Mapper también es capaz de emplear un gel más ancho en el cual pueden depositarse hasta 40 muestras.

Los equipos TAFE y CHEF mencionados son capaces de separar electroforéticamente
25 moléculas de ADN de talla cromosómica. Sin embargo, una desventaja común de los equipos CHEF y TAFE es que las cámaras son innecesariamente grandes y los geles innecesariamente largos, pues las dimensiones no han sido optimizadas, en particular cuando se emplean bloques delgados de muestras. Ha sido demostrado que el grosor de los bloques de agarosa que contienen las muestras de ADN influye en la resolución de las
30 bandas, en el tiempo de electroforesis y en última instancia, determina el largo del gel que se utilice (**López-Cánovas L. y cols. J Chromatogr. A, 1998, 806, 187-197**). En ese trabajo se demostró que si se desea obtener una resolución 'x' entre dos moléculas cualesquiera, ese valor se logra en menos espacio y menos tiempo si las bandas son

delgadas o finas, lo cual logra si los bloques son delgados también. Entre las consecuencias de emplear cámaras electroforéticas grandes están las siguientes:

Cuando se desean aplicar campos eléctricos elevados se requiere emplear fuentes de poder con elevada salida de potencia máxima. Esas cámaras poseen más de 20 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas, por eso, el campo eléctrico máximo que puede aplicarse en dichos equipos está alrededor de 10 V/cm.

Los experimentos son lentos en esas cámaras. Dos factores influyen: se emplean campos eléctricos muy bajos (alrededor de 6 V/cm) y muestras gruesas de más 0,1 cm de grosor.

Por ejemplo, un experimento normal consume 24 horas para obtener un patrón electroforético de once bandas cromosomales correspondientes a moléculas de ADN menores de 1,6 mega bases (10^6 pares de bases) de *Saccharomyces cerevisiae* y hasta 90 horas para separar en 17 bandas las moléculas de ADN del genoma de *Entamoeba histolytica* (Orozco E et al, Mol. Biochem. Parasitol. 1993, 59, 29-40).

Los equipos no son económicos, pues utilizan grandes cantidades de reactivos costosos (tales como el Tris y la agarosa) y de muestra biológica. Esto último puede resultar prohibitivo para ciertas aplicaciones (por ejemplo en el diagnóstico clínico).

Se genera gran cantidad de calor en la cámara de electroforesis cuando se aumenta la fuerza motriz de la electroforesis o campo eléctrico (la misma depende del voltaje aplicado en los electrodos y de la intensidad de corriente que pasa por la solución tampón). Si se desea aumentar el campo eléctrico (en aras de aumentar la velocidad de separación) tiene que hacerse a expensas de aumentar la diferencia de potencial en los electrodos y por ende la intensidad de corriente. Por efecto Joule se aumentaría la generación de calor en la cámara de electroforesis. Un aumento excesivo de la cantidad de calor ensancha y hace más difusas las bandas y provoca distorsión del patrón electroforético llegando incluso al atrapamiento de las moléculas de ADN en los poros del gel y a una ausencia completa de migración.

No obstante, el gran volumen de solución tampón que emplean, estas cámaras tienen la ventaja que permite amortiguar cualquier turbulencia que se forme en la solución al ser recirculada. De igual forma el gel queda tan separado de los electrodos que cualquier cambio local de conductividad en las cercanías de los electrodos, producto de la electrólisis se diluye y casi es imperceptible por el gran volumen de solución.

En 1995 se dieron a conocer los equipos MiniCHEF y MiniTAFE (Riverón A.M. y cols., Anal. Lett, 1995, 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844) donde se

realiza electroforesis de campos pulsantes a 8 muestras depositadas en un gel. Estos equipos superaron las deficiencias de los sistemas anteriormente mencionados. Tanto el MiniCHEF como el MiniTAFE emplean muestras delgadas de menos de 0,1 cm de grosor y permiten aplicar campos eléctricos más intensos brindando en los geles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético. Así, ellos permitieron resolver entre 4 y 5 horas los cromosomas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

La separación entre sus electrodos opuestos es menor, lo que permite construir cámaras más pequeñas y emplear menos volumen de tampón para cubrir los electrodos y el gel (Riverón A.M. y cols., *Anal. Lett*, 1995, 28, 1973-1991; **European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49**). Por eso, en los MiniCHEF y MiniTAFE se genera poco calor, aún con campos eléctricos elevados. Las muestras depositadas en los geles de estos equipos emplean además poco material biológico (Riverón A.M. y cols., *Anal. Lett*, 1995, 28, 1973-1991). Ellos además ocupan poco espacio de laboratorio.

Los autores de estos equipos demostraron que la ECP puede realizarse en geles que no tienen que ser extremadamente largos. Por ejemplo, de 4 cm de longitud. Mediante el empleo de mini-equipos, López-Cánovas L. y cols (López-Cánovas L. y cols., *J Chromatogr A*, 1998, 806, 187-197) demostraron que bloques de más de 0,1 cm de grosor provocan la aparición de bandas gruesas que necesitan más tiempo y más longitud del gel para separarse. Sin embargo, el empleo de muestras gruesas no mejora en calidad el patrón electroforético, ni revela mayor cantidad de bandas.

Los mini-equipos propuestos por Riverón A.M. y cols. para realizar electroforesis de campos pulsantes poseen cámaras cuyos tamaños se calculan sobre la base de la existencia de otros equipos de dimensiones mayores (Riverón A.M. y cols, *Anal. Lett*, 1995, 28, 1973-1991; **European Patent Application EP 0 745 844**). Por tanto, pueden heredar defectos de los equipos a partir de los cuales ellos son diseñados. De hecho, los mini-equipos heredaron de las cámaras grandes un sistema abierto para preparar el gel y la ausencia de un sistema limitador de turbulencias.

En la solicitud de patente y los artículos relacionados no se mencionan los efectos que produce la reducción de los volúmenes del tampón ni del gel sobre el patrón electroforético, es decir, si esos volúmenes de tampón son suficientes para amortiguar las turbulencias del tampón durante la recirculación, ni si las irregularidades en el gel y las diferencias en las dimensiones de los bloques influyen en la calidad del patrón de bandas que se obtienen.

Los efectos dañinos mencionados aumentan con la miniaturización, pues esta tiene asociado un efecto de magnificación de los errores de manufactura. Por ejemplo, si se formara un menisco de 0,1 cm de altura de un gel de 1 cm de espesor el error en la altura del gel sería de 10%, mientras que ese mismo error en un gel de 0,4 cm de espesor representa el 25%. Por tanto, la magnificación de los errores al miniaturizar el sistema puede convertirse en un factor crítico para obtener patrones de bandas reproducibles.

La magnitud crítica de los equipos de electroforesis de campos pulsantes es la distancia entre electrodos, pues ella determina los valores de campo eléctrico que pueden emplearse, o sea la fuerza motriz de las moléculas, las dimensiones de las cámaras, los sistemas que deben emplearse para homogeneizar las variables de la electroforesis, el ancho del gel de separación, el grosor de los bloques donde se incluirán las muestras y el ancho de cada muestra.

Si la separación entre los electrodos de polaridades opuestas no es óptima, por ejemplo, si es demasiado grande, asimismo serán poco óptimas las dimensiones del gel, de la cámara y la cantidad de muestras que pueda depositarse en esos geles. Si los bloques no son del grosor y tamaño apropiados, se puede desperdiciar gel y consumir mucho tiempo de electroforesis. Por otra parte, la forma y la distribución de las dimensiones de las cámaras así como la existencia de una región ZUE única determina que el consumo de reactivos en estas cámaras no sea óptimo. Por tanto, el objetivo deseable es disponer de cámaras que posean dimensiones óptimas, que permitan aplicar campos eléctricos elevados, que sus dimensiones internas varíen de acuerdo con la cantidad de muestras que analicen y que la duración de las electroforesis sea menor sin perder resolución ni la alta capacidad de análisis de muestras.

De los razonamientos anteriores puede concluirse que:

Las cubetas grandes de los sistemas actuales de ECP no son óptimas, por cuanto las distancias entre electrodos de polaridades opuesta son innecesariamente grandes y emplean la misma cantidad de reactivos, independientemente de la cantidad de muestras que serán estudiadas.

No se han optimizado las cámaras. Las relaciones entre las dimensiones de las cámaras (alto, ancho y profundidad) no se distribuyeron para garantizar que la corriente en la cámara no sobrepase fácilmente los límites de salida de las fuentes de poder de ECP y además las moléculas se separen rápidamente a campos eléctricos elevados.

Para que pueda incrementarse el número de zonas ZUE deben realizarse modificaciones constructivas importantes en las cámaras existentes, las que pueden afectar el buen funcionamiento de los sistemas. Esto influye en la optimización del uso de reactivos

Como se mencionó, las cámaras TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE poseen una
5 plataforma de electrodos en la que se coloca un gel (o dos geles en el Geneline II) cuya anchura es igual al ancho de la cámara y su altura depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta (es decir, poseen una región ZUE). En el (los) gel(es), pueden depositarse tantas muestras como permita su ancho, el ancho de dichas muestras y la separación entre ellas. Los equipos con una región ZUE emplean un volumen
10 constante de la solución tampón para cubrir sus electrodos.

Si la cantidad de muestras que se deseara analizar simultáneamente sobrepasara la capacidad máxima de análisis de las ZUE de cualquiera de las cámaras mencionadas (por ejemplo, más de 8 en el MiniTAFE, más de 20 en Geneline I y más de 40 muestras para el Geneline II) sería necesario hacer varias electroforesis, por lo que los patrones de
15 bandas no serían totalmente comparables. Por ejemplo, si se desea caracterizar el genoma de 100 aislados de un microorganismo determinado, ya sea que provengan de un cepario de la industria biotecnológica, de aislados de microorganismos infectando a personas, animales, o vegetales; entonces, esas tres cámaras presentan insuficiencias en su capacidad de analizar simultáneamente más de 8, 20 ó 40 muestras, respectivamente,
20 o son insuficientes las posibilidades que brindan para ampliar su capacidad de análisis. Por eso, cuando es necesario realizar coelectroforesis de numerosas muestras para comparar los patrones de bandas que brindan las moléculas de ADN de dichas muestras, la capacidad máxima de análisis del TAFE (Geneline I, Geneline II) y MiniTAFE puede ser sobrepasada.

25 Una solución conocida, que aumentaría dos veces la capacidad de análisis de muestras de las cámaras mencionadas, es la implementada en la cubeta FIGE OnePhorAll. Esta consistiría en colocar dos peines en el gel de la ZUE. Uno de ellos al inicio del gel y el otro a mediados del mismo. Sin embargo, en el sistema TAFE, las muestras colocadas en los pocillos que formarían ambos peines no estarían sometidas al mismo campo eléctrico ni
30 ángulo de reorientación, por lo que, las moléculas de tallas similares migrarían distancias diferentes en el gel y los patrones de bandas no serían comparables.

Otra solución posible sería construir cámaras más anchas con el gel y zonas ZUE más anchas. Esa solución fue implementada en el Geneline II y supuestamente debería

permitir analizar múltiples muestras (más de 40). Por eso, el Geneline II fue diseñado con una cubeta poco profunda y ancha, pero alta y fue necesario colocar dieléctricos entre los electrodos y el gel para se obtuviera el gradiente de ángulo del sistema TAFE. Esos dieléctricos enlentecieron considerablemente las corridas. Además, la corriente eléctrica en la cámara depende directamente del área de sección transversal que ella ofrece al flujo de iones, por eso, en esas cubetas muy altas y anchas circula una corriente elevada, que supera las del Geneline I y VPFE inicial, por lo que aplicando voltajes bajos se alcanza antes el límite de corriente (I_{max}), o de potencia (P_{max}) de la fuente de poder. Por ejemplo, Macrodrive I, LKB: $I_{max} = 0.4$ A, $V_{max} = 500$ volts, $P_{max} = 200$ Watt; PowerPack 3000 de la Biorad, Cat. 1998-1999: $I_{max} = 0.4$ A, $V_{max} = 3000$ volts, $P_{max} = 400$ Watt; Consort E802, cat. BDH 1997: $I_{max} = 2$ A, $V_{max} = 300$ volts, $P_{max} = 300$ Watt (V_{max} , I_{max} y P_{max} : límites de voltaje, corriente y potencia, respectivamente). Entonces, en ese tipo de cámaras no es posible incrementar la intensidad del campo eléctrico para reducir el tiempo de electroforesis. Los campos eléctricos poco intensos alargan innecesariamente la duración de los experimentos de ECP, lo que reduce el espectro de aplicaciones de esas cámaras en ramas de la ciencia y la técnica que requieren la consecución rápida de resultados. Además, ellas emplean mucho más volumen de reactivos que las existentes. De hecho, la Beckman Instruments ha descontinuado el sistema Geneline II.

Pudieran diseñarse cámaras MiniTAFE más anchas (máximo campo eléctrico aplicable de 25 V/cm para alrededor de 6 cm de ancho), pues ellas no son profundas ni altas (máxima separación entre los electrodos de polaridad opuesta de 15 cm). Por eso, su área de sección transversal puede aumentar hasta que brinde un valor de corriente eléctrica (I) que al aplicar un valor adecuado de E (por ejemplo 3-10 V/cm) aún no exceda los valores máximos de salida de las fuentes de poder existentes. Esas cámaras emplearían además menos volumen de la solución tampón que las cámaras TAFE, Geneline I y Geneline II actuales. En ellas, se obtendrían en tiempo relativamente breve los patrones de bandas. No obstante, una región ZUE muy ancha emplearía un minigel muy ancho, el que presentaría dificultades para ser fundido y manipulado. Por otro lado, pudieran emplearse varios minigeles, pero según la fórmula I, esa cámara no sería eficiente cuando se fueran a analizar pocas muestras.

Por otro lado, cuando es necesario analizar pocas muestras, por ejemplo 8, se desperdicia mucha capacidad de análisis en los geles de los equipos TAFE, Geneline I y

Geneline II, pues ellas poseen una región ZUE única y soportan 20 ó 40 muestras, respectivamente. Los reactivos empleados en los experimentos de ECP son caros. Los equipos aprovecharían eficientemente sus capacidades de separación de moléculas de ADN si el volumen de reactivos que cada vez emplearan las cámaras dependiera de la cantidad de muestras que se fuese a analizar en ese experimento. Eso es imposible en las cámaras de un solo ZUE pues emplean un volumen constante de reactivos. Puede definirse el volumen de reactivos en exceso (ER %) que emplean las cubetas de un ZUE como

$$ER (\%) = 100.0 \bullet (N_t - N) / N_t \quad (I)$$

donde:

N_t: Cantidad máxima de muestras que pueden aplicarse en un minigel.

N: Cantidad de muestras realmente aplicadas en un experimento

(N_t - N): Cantidad de muestras que no se aplicaron en el gel

La Tabla 1 muestra los valores de ER en los sistemas Geneline II y MiniTAFE. A medida que se emplean menos muestras ER crece en ambas cámaras, lo que pone en evidencia que ellas emplean reactivos en exceso cuando se aplican pocas muestras. Aunque el MiniTAFE (datos en la columna 2, Tabla 1) emplea menos volumen de reactivos que el TAFE, ese volumen tampoco varía con la cantidad de muestras analizadas. Por tanto, el volumen de reactivos que emplean las cámaras TAFE Geneline I, Geneline II y MiniTAFE es constante e independiente de la cantidad de muestras que se va a analizar, lo que impide emplearlos óptimamente.

Además, la solución tampón se agota durante la electroforesis. Por eso, para diseñar óptimamente la forma y dimensiones de las cámaras es necesario conocer el tiempo que demora dicha solución en agotarse.

Por otro lado, las cámaras que separan moléculas de ADN empleando el sistema TAFE usan un gel que se coloca verticalmente y sus cátodos se ubican en su parte superior. Por eso, la dirección resultante de la migración es paralela a la del vector de la fuerza de gravedad. Para evitar accidentes con los electrodos al colocar el gel, el Geneline I posee dos plataformas desmontables de electrodos y el gel se coloca en la cámara antes de ubicar dichas plataformas.

Tabla 1. Exceso de reactivos (ER %) empleados en el TAFE Geneline II y en el MiniTAFE.

| N (Nro.Muestras Aplicadas) | TAFE GL-II Bc = 3500 | MiniTAFE Bc = 325 |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------|
| | ER (%) | ER (%) |
| 1 | 97,5 | 87,5 |
| 2 | 95,0 | 75,0 |
| 3 | 92,5 | 62,5 |
| 4 | 90,0 | 50,0 |
| 5 | 87,5 | 37,5 |
| 6 | 85,5 | 25,0 |
| 7 | 82,5 | 12,5 |
| 8 | 80,0 | 0,0 |
| 9 | 77,5 | -- |
| 10 | 75,0 | -- |
| 11 | 72,5 | -- |
| 12 | 70,0 | -- |
| 13 | 67,5 | -- |
| 14 | 65,0 | -- |
| 27 | 32,5 | -- |
| 40 | 0,0 | -- |

--: Significa que el gel no tiene esos pocillos.

5 ER: Es el porcentaje de exceso de reactivos que se emplea

GL-II: Geneline II.

Bc: Volumen total en ml de solución tampón en la cubeta.

10 Para implementar esa solución es necesario ubicar correctamente los electrodos en las plataformas y posicionar correctamente el gel con respecto a las plataformas. Sin embargo, este 'doble posicionamiento', de los electrodos en las plataformas y de éstas con relación al gel, puede variar la disposición relativa entre el gel y los electrodos. Así, este aspecto debe ser mejorado en las cámaras.

Como se mencionó, en las cámaras existentes hay zonas por donde pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan directamente sobre las moléculas depositadas en el gel (ZNU). Esas regiones no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN.

- 5 Los mini-equipos reportados anteriormente tampoco son óptimos, pues no contemplan los aspectos necesarios para amortiguar oscilaciones en la solución tampón ni preparar geles sin irregularidades, ni bloques delgados de tamaños similares en todas sus dimensiones. Hasta el presente, se le ha prestado atención especial a lograr que los valores de voltaje con que se energizan los electrodos de las cubetas se mantengan sin variaciones durante
- 10 el proceso de electroforesis. Esto es particularmente notorio en las cubetas de tipo CHEF, donde se requiere imponer valores dados de voltajes en cada electrodo del arreglo hexagonal. Sin embargo, no solo las variaciones en los valores de voltaje afectan la calidad de los patrones de bandas y la reproducibilidad de los experimentos. La reproducibilidad de los patrones de bandas también se afecta por los factores que
- 15 modifican la homogeneidad de los valores de corriente eléctrica en la cámara y los factores que pueden distorsionar la forma de las líneas de fuerza del campo eléctrico. Esos otros factores no han sido considerados en su totalidad en los sistemas de ECP. Por eso, los sistemas actuales pueden provocar distorsión del patrón de bandas. Esos problemas son especialmente críticos en mini-equipos que emplean geles. Ellos son:
- 20 Las cámaras no poseen aditamentos simples para evitar turbulencias en la solución tampón durante la recirculación del mismo entre la cámara y un intercambiador externo de calor. Los accesorios de preparar el gel de separación no contemplan aditamentos que impidan imperfecciones e irregularidades en el gel donde se realiza la electroforesis.
- 25 Los accesorios para preparar las muestras incluidas en bloques de agarosa no contemplan que los bloques y pocillos deben tener dimensiones similares. Además, no existen aditamentos para lograr buen alineamiento de las muestras en el origen de migración. No existen aditamentos en las cámaras mediante los cuales se garantice que se
- 30 mantenga el grado de tensión de los electrodos. Los aspectos mencionados afectan la obtención de patrones de bandas rectos y la reproducibilidad del patrón en las diferentes carrileras de un gel. En mayor grado afectan

la reproducibilidad de los patrones de bandas en diferentes corridas electroforéticas con un mismo equipo u otro equipo.

Por otra parte, las cámaras de electroforesis de campos pulsantes se llenan con una solución tampón y ésta se re-circula entre ella y un intercambiador externo de calor. Esta
5 solución es el medio a través del cual se establece el campo eléctrico o fuerza motriz a partir de los potenciales que se aplican en los electrodos. Los procesos físico-químicos que ocurren en la solución durante la electroforesis: electrólisis, calentamiento por efecto Joule y variaciones de la concentración del tampón provocan falta de homogeneidad a través del volumen de la solución. La temperatura, concentración y otras variables afectan
10 la viscosidad de la solución y el campo eléctrico que en ella se establece, afectando así la movilidad de las moléculas de ADN de forma diferente a través de toda la cámara cuando alguno de ellos varía incontroladamente. La electrólisis también afecta la conductividad del tampón. La solución que se encuentra en la cámara se intercambia constantemente con otro volumen termostatado a una temperatura fija. Esto se realiza con ayuda de una
15 bomba peristáltica. De esa manera, se intenta que las características de la solución tampón se mantengan homogéneas y constantes durante toda la electroforesis.

El flujo con que se intercambia la solución debe garantizar el recambio total de todo el volumen contenido en la cámara en pocos minutos. Sin embargo, al inyectar la solución a cierta velocidad en la cámara, se producen turbulencias que provocan falta de
20 homogeneidad local en el campo eléctrico aplicado, lo que afecta también la movilidad de las moléculas de ADN que se están separando.

El patrón de bandas resultante es dependiente de cambios en la conductividad de la solución tampón de la cámara y de la presencia de turbulencias en dicha solución. Esas turbulencias se acentúan cuando se re-circula el tampón a alto flujo. Las turbulencias, remolinos u olas varían localmente la altura de dicha solución, modificando aleatoriamente
25 y regionalmente los valores de resistencia eléctrica. Las diferencias de la corriente que circula entre distintas regiones de la cámara modifican la migración de las moléculas de ADN y puede generar patrones de bandas distorsionados.

El equipo CHEF MAPPER de la firma BIORAD contempla en cierta medida este problema
30 **(CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 4. Bio-Rad)**. La cámara de electroforesis CHEF posee dos cámaras pequeñas situadas bajo la cámara principal una al frente y otra detrás. Estas pequeñas cámaras se utilizan para recircular la solución tampón. La solución entra a la

cámara principal a través de seis huecos horadados en el piso cerca del borde. Un deflector de flujo colocado frente a los huecos evita el movimiento del gel. Este sistema sin embargo no es muy eficiente para evitar la formación de turbulencias en la solución, en especial cuando se emplea un flujo alto.

- 5 Ni el TAFE, ni los mini-equipos poseen ningún sistema que limite las turbulencias que pueden crearse en la solución tampón al recircular, lo cual es una desventaja. Es fácil intuir que la influencia dañina de las turbulencias se manifiesta más en cámaras pequeñas que llevan menos volumen de tampón. Por ejemplo, en la cámara del CHEF Mapper, que se llena con 2,2 L de solución tampón, esas turbulencias se amortiguan más fácil que en
- 10 las minicámaras MiniCHEF y MiniTAFE que utilizan casi 10 veces menos volumen.

Como se mencionó, las cámaras grandes de ECP amortiguan en cierta medida las oscilaciones en el tampón. Sin embargo, los mini-equipos de ECP son relativamente recientes, quizás por eso no se ha brindado atención especial al desarrollo de sistemas amortiguadores de turbulencias del tampón.

- 15 Los geles que utilizan los equipos CHEF y TAFE de dimensiones grandes así como el de los mini-equipos, se preparan en un molde de las dimensiones del gel, donde se coloca un peine y se vierte la agarosa fundida. Después se espera que la agarosa solidifique con el molde destapado. Sin embargo, debido a la tensión superficial de la agarosa líquida, esta sube por las paredes del recipiente donde se prepara el gel y forma meniscos. Esos
- 20 meniscos se forman entre los pocillos donde se depositarán las muestras posteriormente o en las paredes del recipiente que se emplea para solidificar el gel. El molde para preparar el gel del TAFE posee una tapa, pero no posee aditamentos que eviten la formación de meniscos entre los dientes del peine. Los geles del CHEF y de los MiniCHEF y MiniTAFE no poseen tapa, por tanto en ellos se forman meniscos en los
- 25 lugares anteriormente mencionados.

- El gel es el medio en el cual ocurre la migración de las moléculas de ADN durante la electroforesis de campos pulsantes. La presencia de meniscos en los bordes laterales del gel, o entre los pocillos, modifica en esas regiones la resistencia eléctrica en el gel y por tanto la corriente eléctrica. Los cambios regionales de corriente en el gel afectan la
- 30 migración de las moléculas de ADN en dichas regiones. Esos cambios son importantes cuando se forman meniscos entre los pocillos donde se depositarán las muestras. Los pocillos son el origen de migración de las moléculas, por tanto, si esas irregularidades introducen cambios en las velocidades de migración de las moléculas, el frente de

migración de las moléculas se originará distorsionado. Entonces esa distorsión se mantendrá durante todo el proceso de electroforesis, obteniéndose al final un patrón distorsionado en esa carrilera del gel. Cualquier irregularidad del gel en otra región también afectará la migración de las moléculas que atraviesan dicha región.

- 5 Desde el punto de vista de reproducibilidad de los patrones de bandas, los accesorios que se emplean para preparar el gel y la manera de emplearlos son por lo tanto importantes. El diseño de sistemas eficientes para electroforesis de campos pulsantes se ha centrado fundamentalmente en brindar cámaras con diferentes configuraciones de electrodos y en brindar una electrónica adecuada para alternar los campos e imponer los voltajes. No se
- 10 ha brindado atención especial a las propiedades de los accesorios para solidificar el gel. Como se mencionó previamente, la electroforesis de campos pulsantes tiene asociada la metodología de preparación de moléculas intactas e inmovilizadas de ADN en bloques de gel. Cuando se desean preparar muestras de ADN inmovilizado es necesario disponer de moldes para la formación de las mismas. Los moldes existentes son los siguientes:
- 15 los que forman bloques similares e independientes (**Cantor C.R. y Schwartz D.C., Patente US. 4, 473, 452**);
- los que forman tiras planas y largas que se cortan para formar bloques independientes;
- los que forman barras o varillas largas de agarosa que se cortan para formar bloques independientes (**Birren B. y Lai E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A practical**
- 20 **guide, Academic Press, New York, 1993, 29-30**).
- En esos moldes se generan muestras que por lo general son de dimensiones mayores que los pocillos del gel. Por eso, se recomienda que para que los bloques posean las dimensiones de los pocillos del gel es necesario cortarlos con un bisturí o cualquier otro implemento (**CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction**
- 25 **Manual and Application Guide pp 40, Section 7. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad**).
- Tanto en las cámaras CHEF, TAFE, MiniCHEF y MiniTAFE, las desigualdades introducidas por los cortes en los bloques de muestras influyen en la calidad del patrón electroforético. Se conoce que el grosor del bloque que contiene la muestra de ADN
- 30 influye en la resolución y el tiempo de electroforesis. Sin embargo, no se han estudiado detenidamente los efectos que provocan en los patrones electroforéticos las desigualdades en las formas y dimensiones de los bloques que se depositan en los pocillos del gel. Tampoco se han estudiado los efectos que provocan la mala alineación

de los bloques en el origen de migración. En consecuencia, los investigadores han empleado los moldes formadores de bloques mencionados en el párrafo anterior, sin embargo, estos moldes no incluyen aditamentos de corte que permitan obtener muestras iguales respecto a su forma y dimensiones, las que además coincidan con las dimensiones de los pocillos del gel.

Si se considera que el patrón de bandas que se obtiene en cada carrilera del gel al final de la electroforesis depende de que todas las moléculas de una talla dada, salgan juntas y aproximadamente al unísono del bloque y del pocillo, es decir, que el frente de migración entre en el gel de separación formando una banda fina y recta, se comprende la importancia de los accesorios que se requieren para preparar los bloques y para alinearlos en los pocillos. Cuando el frente de migración se deforma en el origen de migración, el mismo se mantiene deformado durante toda la electroforesis, pues en la cubeta no existe ninguna otra fuerza ni aditamento capaz de corregirlo. Los defectos al preparar los bloques y los problemas de alineación de los bloques en los pocillos son reproducidos exactamente en las bandas separadas en el patrón, pudiendo llegar a obtenerse bandas que no son rectas y que poseen ondulaciones.

Por otro lado, en la patente **US. 5, 457, 050 de 1995 de GH Mazurek** se reportó un molde para inmovilizar las células y tratarlas en el interior del mismo. Se propuso que ese molde pudiera ser desechable o reusable según el material empleado en su construcción. Además de que ese molde prolonga el tiempo de preparación de muestras, él tampoco tiene asociado un aditamento para cortar los bloques de muestras y así garantizar que en todos los pocillos del gel se depositen muestras similares.

Por otro lado, los equipos TAFE Geneline I y Geneline II fijan sus cuatro electrodos de alambre de platino entre las dos paredes paralelas de acrílico (**Beckman, The Geneline System Instruction Manual, ed. Spinco Division of Beckman Instruments, 1988**). Uno de los extremos de cada electrodo se extiende hacia la tapa continuamente, más allá de la zona útil, hasta salir fuera del alcance de la solución tampón y de la cámara y se une, a través de un conector, con el generador de voltajes externo. Así se garantiza la continuidad eléctrica y la polarización correcta. Para que no forme parte del electrodo, la parte del alambre de platino que se prolonga hasta la tapa se cubre con un capilar plástico de elevada constante dieléctrica, aislándose así de la solución tampón. Como es conocido, los electrodos de platino sufren desgaste en la electroforesis de campos pulsantes. Por eso, el sistema que se emplea en el TAFE para colocar los electrodos tiene

la desventaja que, a medida que se usa, el electrodo va perdiendo su tensión y se dobla u ondula por varias zonas, siendo difícil tensarlo nuevamente, pues se requiere desmontar el electrodo, lo cual no está al alcance del experimentador de manera sencilla. Cuando los electrodos se doblan u ondulan, las líneas isopotenciales en el gel se distorsionan y provocan distorsión de las líneas de fuerza del campo eléctrico, provocando que las bandas no migren en un frente fino y recto.

Por otro lado, la forma de fijar los electrodos en los equipos TAFE representa un gasto excesivo de platino. Por ejemplo el equipo GeneLine I utiliza aproximadamente un metro de alambre de platino mientras que los electrodos activos solo requieren treinta centímetros. El equipo Geneline II tiene un diseño similar.

En el CHEF Mapper, los electrodos (en forma de J) se fijan en soportes de un material de elevada constante dieléctrica de forma que uno de sus extremos lo atraviese (**CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide pp 4 y 65, Section 7. Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad**). Los soportes se insertan en el fondo de la cámara. De esta forma el alambre de platino atraviesa el piso de la cámara y puede unirse eléctricamente al circuito de imposición de voltajes. Para sellar el piso de la cámara se usa un sellante de silicona y anillos de goma que se comprimen con una tuerca. La forma de fijar los electrodos en los equipos CHEF ahorra platino al no tener que sacarlos por fuera de la solución. Sin embargo, no garantiza que los electrodos mantengan su grado de tensión a medida que se usen y por tanto pueden provocar discretas deformaciones de las líneas de fuerza de los campos eléctricos.

Al igual que los equipos TAFE, los equipos MiniTAFE y MiniCHEF reportados (**Riverón A.M. y cols, Anal. Lett, 1995, vol. 28, 1973-1991; European Patent Application EP 0 745 844, Bull. 1996/49**) extienden el alambre de platino después de los electrodos hasta sacarlos de la cámara por encima del nivel de la solución tampón. Así garantizan la comunicación necesaria entre los electrodos dentro de la cámara con los circuitos electrónicos exteriores que los polarizan. Las partes del alambre de platino que no funcionan como electrodos son cubiertos con mangueras de un material de elevada constante dieléctrica para evitar el contacto con la solución. Las cámaras de tipo TAFE utilizan electrodos que miden al menos todo el ancho del gel y quedan suspendidos entre las paredes laterales de las cámaras. Con el uso pierden tensión y se ondulan

parcialmente lo que distorsiona los patrones de bandas. Además, esto significa un gasto adicional de platino que encarece estas cámaras.

Los equipos MiniTAFE separan los cromosomas de *S. cerevisiae* a campos eléctricos intensos (22 V/cm), brindando en los minigeles una resolución adecuada entre las bandas del patrón electroforético (**Riverón et al., Analytical Letters, vol. 28, pp 1973-1991, 1995**). Además, mediante su empleo pueden resolverse en 5 horas los cromosomas de la levadura *S. cerevisiae* a 8 volt/cm y 20 °C. Se consideran MiniTAFE los equipos que poseen menos de 15 cm de separación entre los electrodos de polaridad opuesta. Esa separación permite la construcción de cámaras pequeñas y el empleo de poco volumen de la solución tampón para cubrir los electrodos (350 ml). Cuando en los MiniTAFE se aplica un voltaje dado, es decir un cierto valor de intensidad de campo eléctrico 'E', se genera menos calor que el que se generaría en los equipos TAFE donde se aplicara ese valor de 'E'. Las muestras depositadas en los minigeles de los miniequipos emplean poco material biológico y ellas se incluyen en bloques de agarosa de 0.1 a 0.05 cm de grosor, lo cual además brinda bandas más finas y reduce el tiempo que requiere la electroforesis para brindar un patrón dado de bandas (**López-Cánovas et al., J Chromatography A, 806, pp 187-197, 1998**). El tamaño de los minigeles depende de la separación entre los electrodos de polaridad opuesta. En los minigeles pueden aplicarse tantas muestras como sea posible depositar a lo ancho del mismo, por ejemplo para un gel de 4,0 x 4,0 x 0,5 cm (ancho x alto x espesor) se pueden aplicar hasta 10 muestras de 2,5 mm de ancho, separadas 1 mm.

A pesar de las ventajas expuestas, los equipos mencionados poseen insuficiencias que limitan sus aplicaciones en el análisis de numerosas muestras. En particular, cuando entre un experimento y otro varía considerablemente la cantidad de muestras que se desean comparar o estudiar. Parte de esas insuficiencias se relacionan con la forma y la distribución de las dimensiones de la cámara y con la existencia de una región ZUE única. Existen métodos para seleccionar las condiciones de corrida en equipos de ECP. Por ejemplo, el CHEF Mapper de la Bio-Rad posee una opción de autoalgoritmo y otra de algoritmo interactivo (CHEF Mapper XA Pulsed Field Electrophoresis System. Instruction Manual and Application Guide. 31-40 Catalog Numbers 170-3670 to 170-3673. Bio-Rad). Las dos opciones permiten calcular los tiempos de pulso, la duración de las rampas de tiempos de pulso, el ángulo de reorientación, el campo eléctrico y el tiempo óptimo de corrida para separar las moléculas de ADN de una muestra dada. A diferencia del

autoalgoritmo en el que se asumen condiciones fijas para las variables, el algoritmo interactivo permite variar el tiempo, temperatura, concentración del tampón y el tipo y concentración de agarosa. Ambos algoritmos funcionan sobre la base de datos empíricos y teóricos colectados durante 5 años de experiencias (**Bio-Rad Catalogue. Life Science**

5 **Research Products 1998/99. Bio-Rad Laboratories, 185**), pero los propios fabricantes recomiendan que al autoalgoritmo se le introduzcan tallas superiores e inferiores a las que se desean separar. También que se considere que si el rango de tallas que se introduce, como datos en el autoalgoritmo y en el programa interactivo, es grande los algoritmos pueden brindar resultados erróneos, tales como la inversión de la movilidad de las
10 moléculas en el centro del gel.

Existen otras expresiones empíricas que brindan la duración de los pulsos eléctricos que separarían un grupo de moléculas cuyas tallas están comprendidas entre un valor dado y otro mayor llamado RSL (Resolution Size Limit) (**Smith D.R. Methods I, 1990, 195-203**). Sin embargo, esa relación solo es válida en algunas condiciones experimentales y no
15 predice la resolución entre dos moléculas cualesquiera. También existe una función que brinda las condiciones aproximadas de campo eléctrico y tiempo de pulso que separarían un grupo dado de moléculas (**Gunderson K. y Chu G. Mol. Cell. Biol., 1991, 11, 3348-3354**). Debe notarse que solo permite estimar aproximadamente esos dos valores, pero no brinda la migración de las moléculas en cualquier condición experimental.

20 A pesar de que existen múltiples estudios teóricos acerca de la reorientación de las moléculas de ADN durante la ECP (**Noolandi J., Adv. Electrophoresis, 1992, 5, 1-57; Maule J., Mol. Biotech., 1998, 9, 107-126**), ellos aún no han brindado un resultado práctico de utilidad en los laboratorios. Es decir, no han generado métodos que permitan que el usuario de la ECP seleccione fácilmente las condiciones que debe emplear en la
25 separación de las moléculas que desea estudiar.

Las ecuaciones propuestas por López-Cánovas L. y cols. (**López-Cánovas L. y cols, J. Chromatogr. A, 1998, 806, 123-139**) para describir la migración de las moléculas de ADN en ECP tampoco han sido extendidas para seleccionar las condiciones experimentales que deben aplicarse en un equipo cualquiera cuando se varían el tiempo del pulso, el
30 campo eléctrico y la temperatura.

Hasta el momento, las condiciones experimentales que se aplican en los equipos de ECP provienen más de la experiencia del usuario en el uso de los sistemas de ECP que de ecuaciones que describan la migración del ADN. No existe un método infalible que

prediga cuáles tiempos de pulso y duraciones de los experimentos deben emplearse cuando varían las variables de corrida. Tal método es particularmente importante cuando se trabaja con las mini-cámaras de los mini-equipos, pues en ellos se pueden emplear campos eléctricos intensos, lo que no es común en los restantes sistemas de ECP.

5

ESENCIA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a cámaras de electroforesis de campos pulsantes de los sistemas 'Contour Clamped Homogeneous Electric Field' o 'Transversal Alternating Field Electrophoresis' (TAFE), accesorios y métodos para su empleo.

Las cámaras de la invención son utilizadas para la separación de grandes moléculas de ADN mediante el empleo de electroforesis de campos pulsantes (ECP) en mini-equipos y minigeles, así como en cámaras que usan múltiples minigeles. Las cámaras, accesorios y métodos aquí propuestos poseen aplicaciones en la tipificación de ceparios biotecnológicos de la industria alimenticia, de ceparios de laboratorios de investigaciones y de ceparios de laboratorios clínicos microbiológicos. También poseen aplicaciones en estudios epidemiológicos moleculares de enfermedades infecciosas, así como en el estudio del origen de las contaminaciones en la industria biotecnológica. Pueden ser empleadas en la tipificación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos, en la caracterización del genoma de especies vegetales, de mamíferos y del hombre y en el estudio de enfermedades hereditarias. En esta última aplicación pueden desarrollarse nuevos métodos rápidos y reproducibles para su control y diagnóstico.

La presente invención brinda cámaras de electroforesis de campos pulsantes de tipo CHEF y TAFE de dimensiones óptimas que permiten aplicar campos eléctricos elevados, realizar coelectroforesis en múltiples minigeles a numerosas o pocas muestras y reducir las duraciones de las electroforesis sin perder resolución entre las moléculas ni la alta capacidad de análisis de muestras.

La invención parte de la existencia de sistemas para energizar los electrodos con los valores apropiados de voltaje en las cámaras de electroforesis de tipo CHEF y TAFE. Un sistema como el reportado por Maule (**Maule J. y Green D.K. Anal. Biochem. 1990 191, 390-395**) u otro similar es apropiado para la correcta polarización de los electrodos. También parte de la base de que se dispone de fuentes de poder, intercambiador externo de calor, recirculador para termostatar la solución tampón en la cámara, así como los

reactivos químicos y biológicos necesarios para llevar a cabo el proceso de electroforesis de grandes moléculas de ADN.

La invención aquí propuesta brinda:

- Mini-cámaras de electroforesis de campos pulsantes (ECP) de los sistemas CHEF y TAFE con una zona útil de electroforesis (ZUE) única y en las que se han eliminado las zonas no útiles de electroforesis (ZNU). Las minicámaras permiten recircular la solución tampón a alto flujo sin que se formen turbulencias en la cámara y separan las moléculas rápidamente en patrones de bandas que son reproducibles en todas las carrileras del minigel y entre electroforesis efectuadas en momentos diferentes.
- 10 Multimini-cámaras TAFE con la misma distancia entre los pares de electrodos opuestos de una minicámara, dos o más ZUE que incluyen un minigel cada una y sin zonas no útiles de electroforesis. Estas cámaras poseen una capacidad elevada de análisis de muestras y también pueden analizar pocas muestras sin perder su optimización ni la rapidez de análisis. En ellas se contempla que el gasto de reactivos dependa de la
- 15 cantidad 'N' de muestras que se desea analizar en cada experimento, que el usuario pueda variar la cantidad de regiones ZUE que empleará en cada experimento y que el tiempo de electroforesis sea pequeño.
- Un conjunto de accesorios que limitan la formación de turbulencias en la solución tampón, permiten formar minigeles de caras planas sin que existan irregularidades de ningún tipo
- 20 en su superficie y formar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados.
- Método de empleo de las cámaras y accesorios de electroforesis de campos pulsantes que incluye además un método de calcular el tiempo de electroforesis para diferentes valores de campo eléctrico y temperatura en las cámaras.
- 25 En conjunto las cámaras, accesorios y métodos que son objetos de esta invención, permiten separar en minigeles, de manera rápida y reproducible, grandes moléculas de ADN, empleando agarosa, en un rango de concentraciones entre 0,5 y 1,5%. Más particularmente, las cámaras, accesorios y métodos de esta invención poseen las siguientes características distintivas:
- 30 Emplean minigeles rectangulares o cuadrados en los que pueden llegar a depositarse hasta 200 muestras. La cantidad de muestras depende del ancho del minigel, valor que a su vez depende de la distancia que separa los electrodos de polaridad opuesta en las cámaras de tipo CHEF y del ancho de las cámaras en las de tipo TAFE. La cantidad de

solución tampón que emplea también depende de la separación entre los electrodos de polaridades opuestas y del ancho de la cámara.

Brindan resultados reproducibles en virtud de que tanto las cámaras como los accesorios garantizan valores de corriente eléctrica homogénea en toda la solución tampón y buena
5 alineación de las muestras en el origen de migración. También se garantiza que se mantenga el grado de tensión de los electrodos.

Son capaces de separar rápidamente, al menos en 2,5 horas, a las moléculas de ADN de tamaños hasta 2 mega pares de bases.

Poseen un método para calcular la duración de la electroforesis cuando se varía el campo
10 eléctrico, la temperatura y la duración de los pulsos eléctricos que se aplicarán durante el proceso de electroforesis de las moléculas de ADN.

A.- El cálculo de las dimensiones de los minigeles, las áreas de las cámaras y las cantidades de muestras que pueden depositarse en los pocillos.

15

Para llevar a cabo este cálculo nombraremos 'd' a la separación entre los pares de electrodos de polaridades opuestas. Las dimensiones recomendadas para ancho y largo de los minigeles del CHEF (cm) y la base de la cámara donde se pone el arreglo hexagonal de electrodos y que posee una ZUE única y de la cual se han eliminado las
20 ZNU son:

$$\begin{aligned}\text{ancho del minigel rectangular} &= d / (2 \cdot \cos(30^\circ)) \\ &= d / 1,732\end{aligned}$$

25

$$\begin{aligned}\text{largo} &= d \cdot \{1 - 1 / [2 \cdot \cos^2(30^\circ)]\} \\ &= d / 3\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{lado del minigel cuadrado} &= d \cdot \{1 - 1 / [2 \cdot \cos^2(30^\circ)]\} \\ &= d/3\end{aligned}$$

30

$$\begin{aligned}\text{área de la base de la cámara} &= [2 + (d / \cos(30^\circ))] \cdot [6 + d] \\ &= [2 + (d / 0,87)] \cdot [6 + d]\end{aligned}$$

De la cámara se eliminaron las regiones ZNU debido a que ellas no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN, determinándose que las paredes

laterales de la cubeta deben estar separadas un centímetro de los electrodos y que el sistema de limitación de las turbulencias en el tampón (que se explicará más adelante) debería ocupar 2 cm en cada lado, en la entrada y la salida del tampón. Esa consideración explica además los valores constantes de 2 y 6 de las fórmulas del área de

5 la base de la cámara. Si acotamos 'd' entre 6,2 cm y 15 cm, entonces:

los anchos 'a' del minigel rectangular están comprendidos entre 3,6 y 8,7 cm,

los largos entre 2,1 y 5 cm,

las áreas entre 7,6 y 43,5 cm²

10 los lados del minigel cuadrado están comprendidos entre 2,1 y 5 cm,

las áreas entre 4,4 y 25 cm²,

las áreas de la base de la cámara entre 111,3 y 404,1 cm²

El nivel del tampón en la cámara debe sobrepasar 0,3 cm al minigel, por tanto el volumen

15 de tampón queda definido por

volumen del tampón = $\{[2 + (d / \cos(30^\circ))]\} \cdot [6 + d]\} \cdot (0,3 + \text{grosor del minigel})$

si el grosor de los minigeles está entre 0,35 y 0,5 cm entonces el volumen de tampón estará entre 72,3 y 323,3 mL.

La cantidad máxima de bloques que puede depositarse en los minigeles queda definida

20 según sus anchos 'a' en cm como:

Cantidad de bloques a depositar en los minigeles = $(a - 0,2) / 0,25$

Estando la cantidad máxima en los minigeles rectangulares de 3,6 y 8,7 cm entre 13 y 34 bloques, respectivamente.

25 El largo (en cm) del minigel del TAFE tanto en las minicámaras con una ZUE única o ZUE múltiples (multiminicámaras) es:

largo del minigel = $d \cdot \sin(31^\circ)$

= $d \cdot 0,515$

mientras que su ancho 'a' es igual al ancho de la ZUE. Cuando las cámaras poseen una

30 ZUE única el ancho de los minigeles se corresponde con el ancho de la cámara, mientras que cuando posee dos o más ZUE, la multiminicámara poseerá dos o más minigeles de ancho equivalente al ancho de cada ZUE.

El área (cm²) de cada una de las paredes que sostienen el minigel y los electrodos está dada por

$$\text{Área} = [2+1,4 \cdot d] \cdot [2+0,54 \cdot d] - 1,02 \cdot [1+0,54 \cdot d]^2$$

5

Si acotamos 'd' entre 6,2 y 15 cm, entonces los largos de los minigeles del TAFE están comprendidos entre 3,2 y 7,7 cm en tanto el área de cada una de las paredes que sostienen el minigel y los electrodos estará entre 37,8 y 147,8 cm².

- 10 En las cámaras TAFE mientras menor es la distancia entre los pares de electrodos opuestos ('d'), menor será el área de sección transversal y por ende se podrán aplicar campos eléctricos mayores sin incrementos significativos de la corriente inicial ('I₀') y de la potencia en la cámara. Por tanto, para construir cámaras donde 'L' (el ancho de la cámara o dimensión paralela a los electrodos) sea grande es conveniente que 'd' sea
- 15 pequeña. Esto garantiza que se puedan aplicar valores de 'E' que separen rápidamente los cromosomas sin que 'I₀' exceda el umbral convenido de salida máxima de las fuentes convencionales de ECP. Aunque las cámaras posean separación pequeña entre electrodos opuestos, solo serán óptimas las cámaras anchas capaces de soportar simultáneamente varios minigeles, los que puedan excluirse (o no) de los experimentos
- 20 junto con el volumen correspondiente de tampón. La subdivisión del minigel ancho en varios minigeles más estrechos se logra eficientemente si la cámara se divide en varias regiones ZUE. Cuando en esos minigeles se depositan todas las muestras que ellos admiten, entonces esas cámaras trabajarán a su máxima capacidad y podrán analizar simultáneamente numerosas muestras. Sin embargo, se desperdiciaría capacidad de
- 25 análisis y reactivos si solo se analizaran pocas muestras. Para evitarlo, es necesario que solo se activen las ZUE que se requieran y se excluyan del experimento las no empleadas. De esa forma, el volumen de reactivos que se emplee dependerá cada vez de la cantidad de muestras que se desea analizar y por tanto de la cantidad de regiones ZUE que se activen.
- 30 La cantidad máxima de muestras que se puede analizar simultáneamente en los minigeles del TAFE depende del tamaño y cantidad de ZUE, los que a su vez dependen del ancho máximo (L) que puede tener la cámara. El ancho de la cámara determina la corriente que se extrae de la fuente de poder con que se energizan los electrodos. Por

tanto el factor limitante para construir cámaras TAFE anchas es la capacidad de salida de corriente y potencia de las fuentes de poder de que se dispone. Por lo que conociendo las características de las fuentes de poder, el ancho máximo que pudiera tener la cámara TAFE se puede calcular 'a priori' a partir de ecuaciones que describan la corriente en las mismas.

Para obtener las ecuaciones que describan la corriente en la cámara se construyó una cámara TAFE con una distancia entre los pares de electrodos opuestos en el rango definido para las minicámaras TAFE y un ancho 'L' de 316 mm. En esta cámara fueron eliminadas las zonas no útiles de electroforesis y se le diseñaron aditamentos para variar las dimensiones internas desde 7 cm hasta el ancho 'L' de la cámara lo que permite disponer de 'n' cámaras TAFE de diferentes anchos. Para obtener las ecuaciones, primero se ajusta la función que describe a la conductancia específica ' ρ ' ($\text{mho} \cdot \text{cm}^{-1}$) del tampón TBE 0,5X (1X TBE: Tris 89 mM/L, Ácido Bórico 89 mM/L y EDTA 2 mM/L, pH 8,3) en función de la concentración molar del Tris ($[\text{Tris}]$) y de la temperatura experimental 'T' ($^{\circ}\text{C}$).

$$\rho = 5,190 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{Tris}]^{0,8461} \cdot e^{0,02214 \cdot T} \quad (\text{II})$$

Se considera que la corriente inicial (' I_0 ', en Amperes) en la cámara depende de la resistencia del electrolito, la que está dada por la relación entre la constante de la vasija (' C_v ', en cm^{-1}) y ρ . ' ρ ' es la conductancia específica y la constante de la vasija depende de 'A', o área (cm^2) de sección transversal que ofrece la cámara al paso de la corriente, y de 'd', que es la separación entre los electrodos de polaridad opuesta.

Ya que las cámaras no poseen formas geométricas perfectas porque fueron eliminadas las ZNU es necesario determinar las constantes de las vasijas ($C_v = d / A$) para anchos y formas diferentes. Para determinarlas se ideó el siguiente procedimiento:

- Se determina la constante de la celda de un conductímetro $C_v(\text{cond})$.
- Se llena la cámara de electroforesis con una solución de cualquier electrolito conocido que se mantiene a una temperatura fija.
- Se mide la conductividad de dicho electrolito empleando la celda calibrada del conductímetro G (cond).
- Se mide la conductividad del electrolito, conectando los electrodos de la cámara de electroforesis a los conectores de medición del conductímetro G(cámara).

-Es fácil deducir que $C_v(\text{cámara})$ se obtiene:

$$C_v(\text{cámara}) = [G(\text{cond}) \cdot C_v(\text{cond})] / G(\text{cámara}) \quad (\text{III})$$

- 5 Para cada una de las 'n' cámaras TAFE de anchos ' L_i ' (donde 'i' es un número entre 1 y 'n') diferentes se determina $C_v(\text{cámara})_i$. Entonces puede obtenerse la función que relaciona C_v con L :

$$C_v(\text{cámara})_i = f(L_i) \quad (\text{IV})$$

10

Entonces, en las cámaras de anchos L_i , las resistencias (' Re_i ') al paso de la corriente que brindan electrolitos de conductividad ρ_j están dadas por:

$$Re_i = C_v(\text{cámara})_i / \rho_j \quad (\text{V})$$

15

Desde los estudios iniciales de conductividad se conoce que al aplicar voltaje con una fuente de poder de corriente directa, la corriente que puede medirse en un electrolito no depende solamente de ' Re '. En realidad, ocurre polarización del electrolito, lo cual reduce el valor del campo eléctrico y de la corriente que circula. Por eso, para poder diseñar

20 cámaras TAFE de anchos variables es necesario disponer de las funciones que describen la atenuación del campo eléctrico que provoca la polarización del electrolito.

La atenuación del campo eléctrico en cámaras de electroforesis que tengan anchos y formas geométricas diferentes puede ser estimada si se conoce Re (ecuaciones II, IV y V) y se considera que la resistencia total (R) que se mide en la solución tampón depositada

25 en la cámara puede modelarse como dos resistencias colocadas en serie, Re y R_p

$$R = Re + R_p, \quad (\text{VI})$$

donde R_p juega el papel de resistencia adicional inducida por la polarización del

30 electrolito. Entonces, de acuerdo con la ley de Ohm

$$V_{DC} = I_{DC} \cdot R \quad (\text{VII})$$

donde el voltaje que se aplica con la fuente de corriente directa es V_{DC} y la corriente directa que se mide I_{DC} : Si se aplican valores crecientes de V_{DC} y se determina I_{DC} pueden calcularse los valores de R_t y estimar R_p a partir del conocimiento de R_e (ec. V) en esa cámara. De esa manera se puede obtener la función que relacione R_p con R_e y con V_{DC}

$$R_p = f(R_e, V_{DC})$$

(VIII)

Mediante el empleo de las ecuaciones anteriores pueden ser predichas las corrientes iniciales (I_0) que se obtendrían para voltajes V_{DC} en cámaras de diferentes anchos que contienen tampones de conductividades diferentes y en las que la temperatura de electroforesis pueden ser diferentes. Por tanto, para fuentes de electroforesis cuyas salidas de corriente, voltaje y potencia son conocidas, puede estimarse el ancho máximo que puede tener cada cámara que se emplee con cada fuente existente. Ese ancho es aquel que brinda valores de I_0 y de potencia (P) que no sobrepasen los valores máximos de salida de la fuente. El voltaje que brinda ese I_0 o esa P es el voltaje máximo que puede aplicarse en dicha cámara.

Para diseñar multiminicámaras TAFE, además de poder predecir I_0 , hay que considerar el agotamiento del tampón. O sea, que los incrementos de corriente en la cámara producto del agotamiento de tampón, no sobrepasen los límites de corriente y potencia de la fuente de poder durante el transcurso de la electroforesis. Por eso, hay que disponer de ecuaciones que describan el agotamiento del tampón en el tiempo. El tiempo de agotamiento del tampón debe depender al menos de E . La ecuación para describir a la constante de agotamiento de la solución tampón (k , en Ohm. t^{-1}) puede ser obtenida partiendo del supuesto que cuando se aplica un voltaje V_{DC} (en volts) la corriente I_{DC} (en Amperes) en cualquier momento de la electroforesis está dada por $I_{DC}(t) = V_{DC} / R(t)$, donde,

$$R(t) = R + kt$$

(X)

$$k = f(E)$$

(XI)

y R se calcula según la ecuación VI. Así, mediante el empleo de esas ecuaciones puede predecirse I_0 y como varía la corriente durante la electroforesis, por lo que puede

conocerse el momento de recambio de la solución tampón en cada experimento. Las ecuaciones pueden obtenerse empíricamente, colocando la solución tampón en la cámara, regulando la temperatura, aplicando el voltaje y monitoreando la corriente ('It') durante el tiempo ('t'). Con posterioridad se emplean métodos de regresión para el ajuste de las variables.

Utilizando la relaciones II a la XI se calcula el ancho máximo 'L' de la multiminicámara TAFE el cual depende de la distancia entre electrodos 'd', la conductividad 'ρ' y la temperatura 'T' del tampón así como del campo eléctrico aplicado y está limitado por la corriente 'Imax' y potencia 'Pmax' máximas de salida de la fuente de poder que se utilice para energizarla. Es decir,

$$L = f(I_{\max}, d, \rho, T, E_{\max}) \quad (\text{XII})$$

$$L = f(P_{\max}, d, \rho, T, E_{\max}) \quad (\text{XIII})$$

El ancho máximo 'L' que puede tener la multiminicámara TAFE será el menor de los dos valores de 'L' que se obtienen mediante las funciones XII y XIII.

Utilizando las ecuaciones XII y XIII y empleando fuentes de poder de hasta 2 amperes y 300 watt de corriente y potencia de salida respectivamente se calculó que pueden construirse multiminicámaras TAFE con un ancho 'L' de hasta 50 cm. En dichas cámaras la distancia entre los pares de electrodos opuestos puede ser de hasta 15 cm y puede emplearse tampón TBE 0,5X a una temperatura máxima de 30°C. Estas multiminicámaras se pueden subdividir en ZUE, que si para realizar la electroforesis son empleadas todas se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 8 V/cm y si se inactivan algunas de las ZUE se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 25 V/cm. El número de ZUE puede variar entre 1 y 30.

El área del minigel del TAFE tanto en las minicámaras con una ZUE única o ZUE múltiples (multiminicámaras) es:

$$\begin{aligned} \text{área del minigel} &= d \cdot \sin(31^\circ) \cdot L / ZUE_{\text{total}} \\ &= d \cdot 0,515 \cdot L / ZUE_{\text{total}} \end{aligned}$$

El volumen de tampón en la cámara depende del ancho de la cámara que se seleccione y se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Volumen del tampón} = [(2+1,4 \cdot d) \cdot (2+0,54 \cdot d) - 1,02 \cdot (1+0,54 \cdot d)^2] \cdot L \cdot ZUE_{\text{act}} / ZUE_{\text{total}}$$

Donde,

ZUE_{act} : número de ZUE que están activas durante la electroforesis

ZUE_{total} : número de ZUE en las que está subdividida la cámara

La subdivisión de las cámaras TAFE en ZUE aumenta su eficiencia, lo cual se evidencia si
5 retomamos la fórmula I y definimos.

B_c : Volumen de reactivos en ml (de la solución tampón o agarosa) que requiere la cámara completa.

B_{zue} : Volumen de reactivos en ml que se requiere por cada ZUE donde pueden
10 separarse un máximo de 'NM' muestras.

B_{nt} : Cantidad de reactivos en ml empleados cuando se activa una cantidad dada de ZUE (N_{zue}). $B_{nt} = N_{zue} \cdot B_{zue}$

N_t : Cantidad máxima de muestras que puede aplicarse en las ZUE activadas
 $N_t = NM \cdot N_{zue}$.

15 ($N_t - N$): Cantidad de muestras que no se aplicaron en el experimento.

(B_{nt}/N_t): Volumen de reactivos empleados por cada muestra.

($N_t - N$) • (B_{nt}/N_t): Volumen de reactivos en exceso cuando se aplican 'N' muestras y es posible aplicar ' N_t ' muestras.

20 Si el volumen de reactivos en exceso se relaciona con el volumen de reactivos que requiere la cámara completa (' B_c ') y nombramos 'ER' al resultado, se obtiene:

$$ER (\%) = 100.0 \cdot B_{nt} \cdot (N_t - N) / (N_t \cdot B_c) \quad (XIV)$$

25 Si aplicamos la relación XIV a una cámara de cuatro ZUE , donde cada una requiere 325 ml de la solución tampón y admite un minigel que porta 13 muestras, obtendremos para 'ER' los valores mostrados en la Tabla 2. En ese ejemplo, el comportamiento de 'ER' va desde un valor máximo de 23.1 cuando 'N' es 1, 14, 27 y 40 muestras hasta un mínimo cuando 'N' es 13, 26, 39 ó 52 muestras (Tabla 2). Observe que se propone que cuando
30 solo se emplee una ZUE , las tres restantes se inactiven y ocluyan, por lo que, $B_{nt} = 325$ ml y $N_t = 13$. Así deberá ser si solo se emplearan la primera y segunda miniplataformas; entonces $B_{nt} = 650$ ml y $N_t = 26$. Se procede de igual manera con las restantes miniplataformas. En las cámaras de una sola ZUE , como el Geneline II, $N_t = 40$, $B_c = B_{nt}$

= 3500 ml, mientras que en el MiniTAFE $N_t = 8$, $B_c = B_{nt} = 350$ ml. Por eso, $B_c = B_{nt}$ y $ER = (N_t - N)/N_t$ (Tabla 1). Por tanto, las cámaras deben estar subdivididas en varias regiones ZUE subdividiendo o no la plataforma de electrodos, pero sin perder la capacidad de efectuar coelectroforesis de la cantidad de muestras que se desee, ni gastar
5 reactivos excesivamente, ni emplear más de una fuente de poder.

Tabla 2. Volumen de reactivos en exceso ('ER') en una cámara de cuatro ZUE que admite electroforesis de campos alternantes transversales (MultiMiniTAFE) en cuatro minigeles.

| Bc = 1300 ml | | | | | | | |
|-------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|---------------------|-------|
| ZUE 1 | | ZUE 2 | | ZUE 3 | | ZUE 4 | |
| Nt = 13 Bnt = 325 | | Nt = 26, Bnt = 650 | | Nt = 39, Bnt = 975 | | Nt = 52, Bnt = 1300 | |
| N = 1..13 | | N = 14..26 | | N = 27..39 | | N = 40..52 | |
| N | ER(%) | N | ER(%) | N | ER(%) | N | ER(%) |
| 1 | 23,1 | 14 | 23,1 | 27 | 23,1 | 40 | 23,1 |
| 2 | 21,2 | 15 | 21,2 | 28 | 21,2 | 41 | 21,2 |
| 3 | 19,2 | 16 | 19,2 | 29 | 19,2 | 42 | 19,2 |
| 4 | 17,3 | 17 | 17,3 | 30 | 17,3 | 43 | 17,3 |
| 5 | 15,4 | 18 | 15,4 | 31 | 15,4 | 44 | 15,4 |
| 6 | 13,5 | 19 | 13,5 | 32 | 13,5 | 45 | 13,5 |
| 7 | 11,5 | 20 | 11,5 | 33 | 11,5 | 46 | 11,5 |
| 8 | 9,6 | 21 | 9,6 | 34 | 9,6 | 47 | 9,6 |
| 9 | 7,7 | 22 | 7,7 | 35 | 7,7 | 48 | 7,7 |
| 10 | 5,8 | 23 | 5,8 | 36 | 5,8 | 49 | 5,8 |
| 11 | 3,8 | 24 | 3,8 | 37 | 3,8 | 50 | 3,8 |
| 12 | 1,9 | 25 | 1,9 | 38 | 1,9 | 51 | 1,9 |
| 13 | 0,0 | 26 | 0,0 | 39 | 0,0 | 52 | 0,0 |

10

En estas cámaras el volumen de reactivos ('Bnt' en ml) que se emplea durante cada electroforesis depende de la cantidad máxima de muestras que se vaya a analizar ('Nt') en cada experimento.

Todas las ZUE de una cámara TAFE deben activarse con una sola fuente de poder y deben emplear un solo sistema de alternar los campos.

Si se considera que la fuerza motriz de la electroforesis la provee el campo eléctrico, que esta fuerza es muy superior a la de gravedad y que por su pequeña masa, las moléculas no pueden sedimentar por la acción de la fuerza de la gravedad; entonces es indudable que las moléculas siempre migrarán en la dirección de la resultante entre las líneas de fuerza de ambos campos eléctricos. Por tanto, es posible invertir el ordenamiento de electrodos. Es decir, los cátodos se pueden colocar en la parte inferior de la cámara y los ánodos en la superior, de tal forma que las muestras se colocan en la parte inferior del minigel y las moléculas migran en dirección contraria a la fuerza de la gravedad. Ese ordenamiento invertido lo denominaremos configuración TAFE invertida y facilita la colocación de los geles en el interior de la cámara a la vez que evita los errores del 'doble posicionamiento' de los electrodos y del minigel.

Como resultado de la invención, se proveen cámaras de electroforesis del sistema TAFE en su versión MiniTAFE que son anchas y poseen múltiples zonas ZUE que pueden ser activadas o no a voluntad y energizadas con una sola fuente de poder y en las que se eliminaron las regiones ZNU porque no juegan un papel esencial en la separación de las moléculas de ADN. Por tanto, en esas cámaras pueden colocarse múltiples minigeles y separar simultáneamente las moléculas de ADN contenidas en pocas o en gran cantidad de muestras; por ejemplo, en 10, 20, 30, 40 o más muestras diferentes.

Para llevar a cabo la separación de esas moléculas, dichas cámaras emplean la cantidad de reactivos que se requiere para analizar las 'N' muestras, cuyas moléculas serán separadas en un tiempo 't'.

La separación entre los electrodos de polaridad opuesta es la descrita para la minicámara TAFE, por eso separan las moléculas rápidamente.

Las cámaras son anchas, hasta donde lo permitan las ecuaciones II' - XIII y los valores de salida máximos de las fuentes de poder de ECP (ver el ejemplo en la Tabla 3), por eso son capaces de separar las moléculas contenidas en al menos 52 muestras de 2.5 mm de ancho.

Las cámaras poseen *varias* zonas útiles de electroforesis (ZUE), que pueden ser empleadas en los experimentos o pueden ser ocluidas e inactivadas y solo requieren una fuente de poder y un sistema para alternar los campos eléctricos. Por eso emplean eficientemente los equipos.

La subdivisión de la cámara en varias ZUE simula un ancho variable y hace que 'Nt' y 'Bnt' varíen con la cantidad de ZUE empleadas en la cámara (vea en la Tabla 2 el ejemplo de una cámara de 4 ZUE). El volumen de la solución tampón se reemplaza según predicen las ecuaciones II, III, IV y V. Por eso pueden analizar muchas o pocas muestras empleando los reactivos eficientemente.

Las cámaras pueden construirse con la configuración TAFE convencional o configuración TAFE invertida y pueden ser de acrílico, teflón o cualquier otro material de elevada constante dieléctrica.

Las regiones que no son útiles en la electroforesis (ZNU) se ocuyen con piezas de la forma apropiada que se construyen con material de elevada constante dieléctrica, o se eliminan de las cámaras mediante cualquier procedimiento constructivo.

Pueden existir varias cámaras con las características mencionadas, las llamaremos tipo I y tipo II.

Las cámaras tipo I: Son las más simples y como todas estas cámaras poseen una distancia pequeña entre sus electrodos opuestos, son poco profundas, poco altas, pero son anchas. Sus electrodos son tan largos como ancha es la cámara. Poseen una plataforma de electrodos que puede estar fija en la cámara o puede ser desmontable. Las cámaras tipo I pueden poseer los cátodos en su parte superior (Configuración TAFE convencional), o en la parte inferior de las mismas (Configuración TAFE invertida). En este último caso, las muestras se depositan en la parte inferior de los minigeles, por lo que en cada uno de ellos las moléculas migrarán en el sentido opuesto al de la fuerza de la gravedad.

Cuando los electrodos se disponen en configuración TAFE invertida las regiones ZNU pueden ser eliminadas con las propias paredes de la cámara por donde se deslizan los electrodos. Esas paredes deben formar un ángulo pequeño con el plano que contiene el cátodo y el ánodo que se ubican en el mismo lado del minigel, por lo que al igual que dicho plano, esas paredes formarán un ángulo con el fondo de la cámara de electroforesis. En las cámaras con configuración TAFE convencional las regiones ZNU se eliminan colocando en la cámara piezas de la forma apropiada y construidas de un material de elevada constante dieléctrica.

Esas cámaras poseen varias regiones ZUE y soportan varios minigeles que se colocan a todo su ancho, uno a continuación del otro. Para lograrlo, pueden diseñarse marcos del ancho de la cámara. Ese marco se subdivide en marcos más estrechos donde se funden

- simultáneamente todos los minigeles. El marco grande se coloca posteriormente en la cámara y sirve de soporte a todos los minigeles que se emplearán, permitiendo la manipulación de los mismos. Los minigeles también pueden ser fundidos simultáneamente en esos marcos, después extraídos de los mismos y depositados directamente en la cámara. Para ello, la cámara debe poseer en su centro piezas ranuradas lateralmente por donde puedan deslizarse dichos minigeles. La separación entre estas piezas será igual al ancho del minigel que pueda soportar, es decir al ancho de una ZUE. Para fundir los minigeles el marco debe colocarse entre planchas planas de acrílicos que contemplen donde colocar el peine. Todas esas piezas son fijadas entre sí.
- 5 El marco puede tener ranuras laterales para fijar el peine en una sola posición. A su vez cada minigel admite una cantidad máxima de muestras, lo que depende de su ancho. De esta forma se dispondrá de cámaras con varias regiones ZUE, que admiten un minigel cada una y pueden separar pocas o muchas muestras simultáneamente con una fuente de poder y electrodos comunes. El volumen de solución tampón empleada dependerá de la cantidad de ZUE empleadas. Así todas las muestras de todos los ZUE son además separadas en una solución tampón común, la temperatura del experimento es la misma para todas ellas y el voltaje aplicado es el mismo.
- 10 De acuerdo con todos los principios anteriores se logra que sean variables la cantidad de minigeles que se colocan en la cámara y el volumen de reactivos ('Bnt') empleados por cada experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ('Nt') que pueden analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.
- 20 Las cámaras tipo II. Una variante de cámara que se propone en esta invención y que evita el empleo de electrodos muy largos se describe a continuación. Al igual que las cámaras tipo I, las cámaras tipo II poseen una distancia pequeña entre sus electrodos opuestos, por lo que tienen poca profundidad y altura. Sin embargo, cada región ZUE está contenida en una miniplataforma de electrodos y estas pueden ser extraídas de la cámara y se colocan una detrás de otra. Cada una de ellas emplea un minigel en el que se depositan tantas muestras como admite su anchura, la que a su vez depende de la longitud de los electrodos de las miniplataformas.
- 25 Los electrodos de una o varias miniplataformas pueden ser energizados o no empleando una sola fuente de poder. Para lograrlo, los electrodos de las miniplataformas se conectan en paralelo, es decir los ánodos consecutivamente y los cátodos consecutivamente. A diferencia de las cámaras tipo I, las regiones ZUE (o miniplataformas de electrodos) que
- 30

no serán activadas en un experimento cualquiera pueden ser totalmente ocluidas con piezas que poseen una forma similar a la de la miniplataforma. Esas piezas se fabrican de un material de elevada constante dieléctrica. La conexión en paralelo entre las miniplataformas de la cámara garantiza la continuidad ente los electrodos de todas las miniplataformas de electrodos y permite que se realice la coelectroforesis a todas las muestras de todos los minigeles con una fuente de poder y electrodos comunes. Así, todas las muestras son además separadas en una solución tampón común, la temperatura del experimento es la misma para todas ellas y el voltaje aplicado es el mismo para todas. De acuerdo con los principios anteriores se logra que sea variable la cantidad de ZUE que puede ser activada en la cámara, el número de minigeles que se empleará en un experimento, y el volumen de reactivos ('Bnt') por experimento. También se logra variabilidad en la cantidad máxima de muestras ('Nt') que puede analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

En las cámaras tipo II, las múltiples miniplataformas de electrodos podrían poseer sus cátodos en su parte superior (configuración TAFE convencional) o en su parte inferior (configuración TAFE invertida).

En las cámaras tipo II, donde los electrodos se disponen en configuración TAFE invertida las regiones de la solución tampón por donde pasan las líneas de fuerza que no atraviesan el minigel pueden ser eliminadas con las propias paredes de la cámara. Para lograrlo, las paredes frontales de la cámara por donde se deslizan los electrodos deben formar un ángulo pequeño con el plano que contiene el cátodo y el ánodo que se ubican en el mismo lado del minigel (o formar un ángulo pequeño con dicho plano), por lo que al igual que dicho plano, esas paredes formarán un ángulo con el fondo de la cámara de electroforesis.

En la construcción de las cámaras tipo II, puede emplearse cualquier procedimiento o conexión para activar e inactivar las miniplataformas. Por ejemplo, colocar en la tapa los cables de conexión entre miniplataformas vecinas, o solo colocar en la tapa los conectores y que los cables sean exteriores, o colocar esas conexiones en las paredes de la cámara, o directamente entre las miniplataformas. Por otro lado, las miniplataformas pueden ser de cualquier forma que se ajuste bien a la cámara, siempre y cuando contengan su ordenamiento de electrodos en configuración TAFE, mientras que los electrodos de las miniplataformas pueden ser puestos permanentemente en la cámara, o en miniplataformas que pueden ser desmontadas de dicha cámara. Las regiones de la

cámara donde no se van a activar miniplataformas, pueden ser eliminadas del experimento por cualquier procedimiento, ya sea colocando en ellas un bloque macizo, o bloques huecos que se fijan de cualquier manera a las paredes o se llenan de cualquier líquido. De manera similar a como se hace con las cámaras tipo I, los minigeles pueden
5 ser fundidos en marcos, que pueden o no colocarse en la electroforesis.

B.- La obtención de patrones de bandas reproducibles en las cámaras provistas en esta invención.

Como ya se mencionó, las cámaras provistas en esta invención se distinguen por:

10 -Poseer un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución tampón y además homogeniza la temperatura y composición del tampón en la cámara de electroforesis.

-Disponer de un sistema para introducir o retirar los electrodos en la cámara de electroforesis, el que además garantiza que se mantenga el grado de tensión de los
15 electrodos. Ese sistema emplea tapones elásticos que se colocan en orificios perforados en el piso o en las paredes laterales de las cámaras. Por la luz de dichos tapones se pasan los electrodos.

-Disponer de un sistema para que el experimentador pueda tensar los electrodos de la cámara MiniTAFE y multiminiTAFE.

20 En esta invención también se proveen un grupo de accesorios que son importantes para lograr patrones de bandas reproducibles. Ellos son:

-Un sistema que permite preparar minigeles planos. Ese sistema garantiza la homogeneidad de todas las dimensiones de los minigeles.

-Un sistema que permite alinear en el origen de migración del minigel a los bloques que
25 contienen las muestras.

-Un sistema para preparar bloques de tamaños homogéneos.

B.1.-Sistemas limitadores de turbulencias y homogeneizadores de la conductividad y temperatura del tampón en la cámara.

30 Es bien conocido que en las cercanías de los electrodos el tampón cambia sus propiedades conductivas debido a la electrólisis que ocurre en los electrodos. Esto es particularmente importante en el CHEF, que posee un ordenamiento hexagonal de múltiples electrodos que rodean al minigel. Por eso, en esas regiones de la cámara la

conductividad ' σ ' del tampón puede ser diferente del valor de conductividad en otras regiones de la cámara. Esto es crítico en las mini-cámaras CHEF. La recirculación del tampón electroforético a alto flujo es equivalente a agitar dicha solución, pues es la manera de garantizar homogeneidad de la conductividad de todo el tampón de la cubeta de electroforesis. Por ejemplo, un recambio del volumen total de la cubeta en 3 minutos es suficiente para este fin.

Cuando ese electrolito recircula a alto flujo se generan turbulencias del fluido en la cámara. Otro posible origen de las turbulencias es que algunas bombas peristálticas que se emplean, inyectan el tampón en porciones como si fueran pulsos de líquido.

10 El sistema de recirculación del tampón a alto flujo desarrollado en esta invención se basa en el siguiente principio: Es necesario garantizar que el área de sección transversal al paso de la corriente en el tampón donde se sumerge el minigel, sea constante en toda la cámara de electroforesis. Así se impide que la corriente que recircula en la cámara se modifique aleatoriamente por los cambios locales de resistencia del tampón provocados
15 por la presencia de olas, remolinos o turbulencias durante la recirculación. El principio se fundamenta en que la resistencia (R) del tampón de un electrolito cualquiera que se deposita en la cámara de electroforesis está dada por:

- la conductividad del electrolito (σ),
- la separación entre los electrodos de polaridades opuestas (d),
- 20 -el área de sección transversal al paso de la corriente (A).

Estas variables se relacionan según la fórmula XV.

$$R = (1 / \sigma) \cdot (d / A) \quad (XV)$$

25 Por eso cuando ' A ' es diferente en zonas de la cámara, ' R ' también lo es y la corriente eléctrica ' I ' también.

El sistema limitador de turbulencias en las cámaras CHEF está formado por:

- dos tipos de láminas rectangulares, las de tipo A y las de tipo B, las que son de cualquier material de elevada constante dieléctrica,
- 30 -láminas que son del ancho del interior de la cámara, siendo las de tipo A de al menos 2 cm de altura y las de tipo B de 0,5 cm de altura,
- láminas de tipo A que están despegadas de la base de la cámara una distancia entre 0,02y 0,05 cm y siempre sobresalen de la solución tampón que se deposita en la cámara,

de tal forma que al recircular el tampón por el interior de la cámara, este fluye solamente entre las láminas de tipo A y la base de la cámara,

-láminas de tipo B que están pegadas a la base de la cámara y sumergidas totalmente en la solución tampón, de tal forma que al recircular el tampón en la cámara, este fluye
5 solamente por encima de las láminas de tipo B, donde ambos tipos de láminas se ubican en la entrada y en la salida de la solución tampón de la cámara, desde la pared de entrada o salida de las mangueras hacia el interior de la cámara de electroforesis y en el siguiente orden, lámina de tipo A después lámina de tipo B, repitiendo 'n' veces ese par de láminas, donde 'n' es un valor entero entre 1 y 4 y quedando la última lámina
10 aproximadamente a 1 cm de los electrodos, última lámina que debe ser de tipo A.

Así, el tampón proveniente del intercambiador de calor choca con la lámina de tipo A al caer en el interior de la cámara y pasa por debajo de ella. Después vuelve a chocar con la de tipo B y pasa sobre esa otra lámina. Hechos estos que se repiten con cada par de láminas del sistema limitador de turbulencias, hasta que dicho tampón pasa al
15 compartimento donde se encuentran los electrodos y el minigel y lo atraviesa. Después el tampón sufre el mismo proceso en la región de la cámara desde la cual sale el tampón hacia el intercambiador de calor. Así se logra amortiguar cualquier oscilación que pueda existir en la superficie del líquido.

El sistema de limitación de turbulencias de la solución tampón en las cámaras TAFE está
20 formado por:

- dos láminas iguales y del mismo tamaño de las paredes de la cámara que son paralelas a los electrodos,
- láminas estas que son de un material de elevada constante dieléctrica y poseen una ranura horizontal en su tercio inferior,
- 25 -ranura que es del largo de los electrodos y de 0,3 cm de altura.

En este sistema las láminas están ubicadas, una de ellas en la entrada de la solución tampón y la otra en la salida de dicha solución. De esa forma, dividen la cámara en tres compartimentos: el central que contiene los electrodos y el minigel, y los otros dos, por los que entran o salen las mangueras de la recirculación. Durante la recirculación, el tampón
30 cae directamente en uno de esos compartimentos y de ahí fluye hacia el compartimento de electroforesis pasando por la ranura horizontal. Del compartimento de electroforesis sale pasando por la ranura horizontal de la otra lámina y cae en el compartimento donde

se encuentra la manguera de salida. De este último sale hacia el intercambiador de calor. Así se amortigua cualquier oscilación que pueda existir en la superficie del líquido.

B.2.-Sistema de accesorios para garantizar homogeneidad de la corriente en el minigel.

- 5 Si se sigue el razonamiento anterior se comprende que si el gel, o matriz sobre la cual se realiza la electroforesis posee irregularidades, brindará un área (A) de sección transversal a la corriente que difiere entre sus diferentes regiones. Por tanto, 'Rm' (resistencia al paso de la corriente en el gel) tiene que mantenerse constante en todas las regiones del gel. El sistema para formar minigeles de caras planas es en un dispositivo desarmable que
- 10 consta de:
- una base plana.
 - dos marcos, uno de ellos con una cavidad de forma rectangular y el otro con una cavidad cuadrada de 0,35 a 0,5 cm de espesor, los que poseen dos muescas donde se coloca un
 - 15 marcos y las dimensiones internas de las cavidades determinan las dimensiones del minigel que se va a preparar para ser colocado como matriz de soporte en la electroforesis en las cámaras CHEF o TAFE.
 - dos tapas, la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, y la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine.
 - 20 -un segundo peine similar al anterior pero que posee dientes más cortos y permite empujar las muestras que se depositaron en los pocillos del minigel.
- Los peines de dientes largos que imprimen los pocillos en el minigel, son en su parte anterior totalmente lisos y continuos con los dientes, mientras que en su parte posterior y por encima de los dientes están engrosados, formándose un escalón. Los peines
- 25 provistos poseen dientes iguales de espesor comprendido entre 0,03 y 0,1 cm, ancho entre 0,15 cm y el ancho del minigel menos 0,3 cm y longitud de los dientes igual al espesor del minigel menos 0,15 cm. Así, al ensamblarse el peine, el marco y la base plana, los dientes quedan separados 0,1 cm de la base y el escalón posterior queda 0,1 cm más alto que el espesor del marco. Los peines de dientes cortos son iguales a los
- 30 peines de dientes largos, pero sus dientes son 0,2 cm más cortos.
- La tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, posee dos caras planas. En uno de sus bordes tiene un reborde saliente que encajará en el marco al ser ensamblado el sistema. La tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, tiene una cara

plana y la otra también plana, pero está rebajada en forma de cuña en uno de sus extremos.

El sistema se emplea de la siguiente forma:

- sobre la base plana se coloca uno de los dos marcos, específicamente el que posee el tamaño del minigel que se desea preparar.
- se encajan las patas de uno de los peines de dientes largos en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior, con lo cual quedarán los dientes separados 0,1 cm de la superficie de la base plana.
- la tapa 1, que encaja en la parte delantera del peine, se coloca sobre el marco y por delante del peine, con la cara plana volteada hacia el marco, la cara rebajada hacia arriba y la rebaja en forma de cuña pegada al peine,.
- dicho conjunto se inmoviliza apretando las tapas contra el marco por cualquier medio hasta que la cavidad que se forma entre ellos quede eliminada y se vierte el minigel fundido a una temperatura apropiada, que cuando es agarosa está entre 65 y 70 °C
- la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine, se coloca sobre el marco, por detrás del peine, introduciendo el reborde en el escalón del peine de dientes largos, y se deja el sistema en reposo hasta que dicho minigel solidifique.
- se retira el peine de dientes largos y en la ranura en forma de cuña de la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, se colocan los bloques de minigel que contienen las moléculas de ADN inmovilizadas, los que se hacen resbalar hacia los pocillos empujándolos con un aplicador cualquiera,
- una vez colocados los bloques en los pocillos del minigel, dichos bloques se empujan hacia el fondo de los pocillos con la ayuda del peine de dientes más cortos, lo cual se hace encajando sus patas en las muescas que posee el marco, lo que garantiza que ellos se introduzcan hasta el fondo de los pocillos.
- Así se garantiza que se obtenga un minigel plano, sin meniscos, en el cual todas las muestras fueron colocadas a la misma altura y a la misma distancia del borde posterior o anterior del minigel. Todo lo anterior se logra sin que ocurra aplastamiento o ruptura de dichos bloques.
- El sistema para formar minigeles planos y el limitador de turbulencias impiden que el área de sección transversal del minigel varíe incontroladamente, por la formación de meniscos en las paredes del recipiente empleado para formar el minigel o entre los pocillos del minigel.

B.3.- Sistema de accesorios para formar bloques de tamaños homogéneos.

No obstante, aunque se garantice que el valor de 'R' sea constante en todo el tampón de la cámara y en el minigel, si los bloques de agarosa que contienen las moléculas de ADN inmovilizada no son todos de dimensiones similares y se colocan en línea recta en el minigel, sin romperlos y a la misma distancia de los bordes anteriores y posteriores de los minigeles, entonces los patrones de bandas resultan distorsionados.

Los accesorios para preparar muestras de ADN incluidas en bloques de gel de dimensiones homogéneas y similares a la de los pocillos del gel donde serán depositados constan de:

- 10 -formadores de bloques de gel que consisten cada uno de ellos en una lámina plana de cualquier material impermeable con espesor mayor que 0,5 cm, lámina que posee múltiples ranuras paralelas a todo su largo, donde el ancho de cada ranura es de 0,2 cm, su profundidad es del espesor de los dientes de un peine dado, la que puede ser entre 0,03 y 0,1 cm, existiendo formadores para todos los posibles espesores de los dientes de
- 15 todos los peines que pueden emplearse para imprimir los pocillos en el gel,
- otra lámina plana y rígida de material impermeable de al menos 0,1 cm de espesor que actúa como tapa de los formadores de bloques,
- cortadores de bloques, donde cada uno es una barra que posee patas en sus extremos, lo que le confiere la forma de una 'U' invertida, cuadrada y tan o más larga que las
- 20 ranuras del formador de bloques, teniendo en la parte inferior de la barra varias protuberancias en forma de cuchillas, transversales a la longitud mayor de la barra y con el filo hacia abajo, donde el largo del extremo afilado de cada cuchilla es 0,2 cm y cada cuchilla sobresale por debajo de la barra más de 0,1 cm, estando las cuchillas de cada formador separadas una distancia específica que puede ser entre 0,1 cm y el ancho del
- 25 gel menos 0,3 cm,
- poseen un método de empleo.

El uso de estos accesorios incluye los siguiente pasos:

- se prepara una suspensión de células en agarosa que se mantiene a 45 °C y se ambienta el formador de bloques y su tapa a 45 °C,
- 30 -se vierte dicha suspensión en las ranuras del formador de bloques,
- se cubre el formador de bloques con su tapa y se coloca a temperatura ambiente o en frío,
- se espera a que solidifique el gel,

- una vez solidificado el gel se coloca el cortador de bloques a lo largo de la primera ranura, con sus cuchillas hacia abajo y los filos transversales a la dimensión mayor de la ranura,
 - se presiona hacia abajo el cortador de bloques.
- 5 -se retira el cortador, se inclina el formador de muestras y se empujan los bloques hacia el interior de un recipiente que contiene la solución apropiada para el tratamiento de los bloques,
- se repite el proceso con las tiras de agarosa que solidificaron en todas las ranuras del formador.
- 10 Así se garantiza que los bloques formados sean todos iguales y sus dimensiones coincidan con las dimensiones de los pocillos del gel donde serán depositados para someter después a las moléculas de ADN al proceso de electroforesis.

B.4.- Sistema de fijación y tensión de electrodos para evitar distorsiones de las líneas isopotenciales en las cámaras de electroforesis

- 15 En esta invención se consideró que para que el gradiente de potencial aplicado a las moléculas durante la electroforesis no varíe aleatoriamente, es necesario que las líneas isopotenciales en el gel no estén distorsionadas. Eso se logra si los electrodos mantienen su estado de tensión. Para lograrlo, en esta invención se introdujeron los electrodos en la
- 20 cámara a través de agujeros perforados en la base de las cámaras CHEF o en las paredes de las cámaras TAFE. En los agujeros se colocan entonces tapones elásticos de silicona, por cuya luz pasan los electrodos que provienen del exterior. Así se garantiza que, aunque el electrodo adelgace por su uso en la electroforesis de campos pulsantes, siempre estará aprisionado por el tapón y por tanto fijado.
- 25 En el sistema TAFE los electrodos son además largos. Por eso, en ocasiones, ellos se arquean. Para evitar ese problema, en esta invención se dotó a las cámaras TAFE de un sistema para tensar los electrodos. El sistema consta de:
- un vástago ranurado en su parte superior, vástago que gira y posee una muesca en forma de cintura, la que está atravesada por un orificio,
- 30 -orificio este, por donde se inserta el extremo de un electrodo y se dobla para que rodee la cintura del vástago,
- un prisionero que inmoviliza definitivamente al vástago en la posición deseada.

Este sistema se coloca en la salida del electrodo de la cámara. Los electrodos los tensa el experimentador mediante el siguiente procedimiento:

- Se afloja el prisionero que inmoviliza al vástago en el cual está insertado el electrodo,
- Se hace girar el vástago el ángulo requerido para que queden tensos dichos electrodos,
- 5 -Se aprieta el prisionero para inmovilizar al vástago en su posición actual y mantener tenso el electrodo.

De esta forma se garantiza la existencia de líneas isopotenciales sin distorsión a todo lo ancho del gel vertical del TAFE.

- En esta invención se garantizan los patrones reproducibles ya que se emplea un sistema adecuado para energizar los electrodos con los valores apropiados de voltaje y estos se mantienen tensos, además se emplean sistemas para garantizar que las migraciones de las moléculas de ADN de cualquier tamaño no sean perturbadas por cambios locales transitorios en la resistencia del tampón o del gel. Esos cambios provocan distorsiones en las carrileras de migración y en las bandas que forman las moléculas después del proceso de electroforesis.

C.- Métodos de empleo de las cubetas de esta invención y método de cálculo para seleccionar el tiempo de electroforesis en las cámaras

- En esta parte de la invención se creó un método de cálculo en el cual se estima el tiempo de electroforesis para condiciones diferentes de campo eléctrico, temperatura y duración de pulsos eléctricos. Se basa en que existe un conjunto de ecuaciones que describen la migración por pulso 'm' de una molécula lineal de ADN en los equipos CHEF (**López-Cánovas L y cols, J. of Chromatogr. A 1998, 806, 123-139**) las que se incorporan totalmente como referencia.

$$25 \quad m = v_r \cdot t_p \cdot \Gamma(t_p - t_r) + v_m \cdot (t_p - t_r) \cdot [1 - \Gamma(t_p - t_r)]$$

donde

$$v_r = 0,0207 \cdot [Q \cdot E^{1,45} / (8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L^{1,35})];$$

$$v_m = 0,665 \cdot [Q \cdot E^{1,76} / (8 \cdot \pi \cdot \eta \cdot L^{1,08})];$$

$$t_r = 0,134 \cdot (L^{1,14} / v_r)^{0,926};$$

$$30 \quad \Gamma(t_p - t_r) = 1 \text{ si } (t_p - t_r) \leq 0 \quad \text{y} \quad \Gamma(t_p - t_r) = 0 \text{ si } (t_p - t_r) > 0.$$

En estas relaciones las variables y parámetros tienen las siguientes definiciones:

'tr' es el tiempo de reorientación (en seg) de una molécula de ADN lineal,

'vr' y 'vm' son las velocidades de migración (en cm/segundos) de dicha molécula durante y después de la reorientación, respectivamente.

'Q' es la carga neta de la molécula (en statcoulomb) dada por $1e^- \cdot bp$, donde 'e' es la carga del electrón y 'bp' los pares de bases,

5 'L' el largo del contorno (en cm) de la molécula lineal de ADN, dado por $0,34 \text{ nm} \cdot bp$,

'E' es la intensidad del campo eléctrico en statvolts/cm,

' η ' es la viscosidad del tampón en Poises, calculada interpolando el valor de la temperatura experimental en un polinomio que relaciona la viscosidad del agua con la temperatura (en °C) experimental,

10 'tp' es la duración del pulso (seg).

Para alimentar el método se calcula primero la migración por pulso 'm' de la molécula más pequeña. Esto se realiza:

-suministrando a las relaciones anteriores los valores de campo eléctrico, temperatura y tiempo de pulso que se emplearán en la electroforesis,

15 -suministrando a las relaciones anteriores el tamaño, en pares de bases 'bp', de la molécula de ADN más pequeña que se desea separar,

-calculando 'm' siempre y cuando el campo eléctrico y la temperatura estén comprendidos entre 5,8 y 16 V/cm y entre 10 y 30 °C, respectivamente, y asumiendo que en el proceso de electroforesis se emplea agarosa al 1,5 % y como tampón de electroforesis TBE 0,5X

20 (TBE 1X: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3).

Una vez que se dispone de la migración por pulso, este valor se emplea para alimentar al método de cálculo del tiempo de electroforesis. En dicho método el tiempo de electroforesis (te, en segundos) se calcula como:

$$te = [(D/m) \cdot 2 \cdot tp]$$

25 El método requiere además como dato la distancia 'D' en centímetros que se desea que la molécula más pequeña migre en el gel. El valor preferente de 'D' es la distancia entre el origen de migración y el borde inferior del gel menos 0,1 ó 0,2 cm. Según el método los tiempos de electroforesis a 30°C para separar moleéculas de ADN de hasta 2 Mb están comprendidos entre 1,5 y 9 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente, mientras que para

30 10 °C ellos están entre 2,5 y 14,5 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente.

Todos los pasos anteriores garantizan el correcto empleo de la cubeta y que cuando se aplica la misma intensidad de campo eléctrico, temperatura, tiempo de electroforesis, concentración de tampón, de gel y duración de los pulsos eléctricos se obtienen los

mismos patrones de bandas. El método para llevar a cabo el proceso de electroforesis en las cubetas de invención, con la ayuda de los métodos y accesorios mencionados se resume en los siguientes pasos:

- se conecta la cámara a los dispositivos de alternar los campos eléctricos y se energizan los electrodos, se llena la cámara con solución tampón, se conecta la cámara al intercambiador externo de calor, se verifica que el sistema limitador de turbulencias está correctamente ubicado y se recircula la solución tampón a través de la cámara hasta que se alcance la temperatura deseada,
 - con la ayuda de los accesorios para preparar geles planos y empleando el peine apropiado se preparan geles para la separación de las grandes moléculas de ADN, geles que son de hasta 0,5 cm de espesor según la cámara seleccionada,
 - se depositan en los pocillos del gel los bloques de gel que contienen las moléculas de ADN que serán separadas, las que estaban previamente incluidas en dichos bloques, siendo las dimensiones de los bloques similares a la de los pocillos del gel,
 - se detiene temporalmente la recirculación y el gel que contiene los bloques se sumerge en la solución tampón que ya se encuentra a la temperatura deseada, se restaura la recirculación,
 - se calcula el tiempo de electroforesis que separará a las moléculas de ADN empleando un método de cálculo que depende de las condiciones experimentales que serán empleadas y del largo del gel en el que se realizará la electroforesis,
 - se energiza el sistema y se realiza la electroforesis de las moléculas de ADN sobre el gel de caras planas, llevando a cabo la recirculación de la solución tampón a alto flujo.
- A modo de resumen, las cámaras de esta invención son pequeñas, poseen distancias entre sus electrodos de polaridades opuestas que determinan todas sus dimensiones. A pesar de que son cámaras electroforéticas pequeñas, sus geles son lo suficientemente largos para evidenciar la separación de las grandes moléculas de ADN en patrones de bandas. Por tanto, las cámaras admiten gran cantidad de muestras, lo cual las convierte en una nueva herramienta para estudios que requieran resultados rápidos y la comparación de los resultados que brindan numerosas muestras. Este proceso puede realizarse en poco tiempo, con poco gasto de reactivos y de material biológico.
- A continuación se muestran varios ejemplos de realización de las cámaras y accesorios provistos en esta invención.

Ejemplos de Realización:

Ejemplo 1. Cámaras con zonas útiles de electroforesis múltiples: multiminicámara

5 TAFE tipo I.

En la figura 1 se muestra una vista isométrica en explosión de la cámara **1**. En la vista se muestran los cuatro electrodos **2** en configuración TAFE convencional. La anchura **3** de la cámara es de 316 mm, la altura **5** es 74 mm y la profundidad **6** es de 114 mm. También se señalizan las paredes frontales **8** y laterales **9** de la cámara. El fondo **18** de la cámara posee la excavación **7** sobre la cual descansa el marco **16** donde se funden los minigeles **20** que emplea esta cámara. En las paredes laterales **9** se ubican las ranuras **4** por las cuales se desliza el marco **16**. Las dimensiones del marco son: 48 mm de altura, 320 mm de ancho y 5 mm de grosor. Este marco soporta 4 minigeles **20** de 38 mm de altura y 71.25 mm de ancho. Se muestra la ubicación de los pocillos **21** en los minigeles **20**. Esos pocillos se forman al colocar un peine cuyos dientes son de 3 mm de ancho y se separan entre sí 2 mm.

La figura 1 muestra un esquema tridimensional de la tapa **22**, de los bloques **17** que se colocan para eliminar de la cámara las regiones ZNU, y de los bloques **15** que se colocan para eliminar de la cámara las regiones ZUE.

La figura 2 muestra los detalles de la vista lateral de la cámara **1**. Señalizado con cruces (+) se muestra la ubicación de los extremos de los electrodos **2** en dicha pared, con los cátodos colocados en su parte superior y los ánodos en la inferior. Los electrodos son de 316 mm de longitud y se colocan paralelos con la pared frontal (**8** en la figura 1) de la cámara. En el centro de la pared lateral (**9** en la figura 1) y equidistante de los ánodos o cátodos se ubica la ranura **4** por donde se desliza el marco **16** que contiene los minigeles, o solo los minigeles de 5 mm de espesor. Sombreados con líneas inclinadas se muestra la ubicación de los bloques **17** que eliminan de la cámara las regiones ZNU, la tapa **22** de la cámara y el fondo **18**. Las caras externas de los bloques **17** son paralelas a las paredes frontales **8** de la cámara, mientras que sus caras internas pueden formar un pequeño ángulo con el plano que contiene al cátodo y al ánodo de un mismo lado del gel. Existen tantos bloques **17** como regiones ZUE haya en la cámara. Los bloques **15** se emplean para ocluir regiones ZUE.

La cámara **1** (figura 1) posee cuatro regiones ZUE. En las regiones ZUE activas se colocan los bloques **17** (figura 2) que eliminan las regiones ZNU. Para ocluir las regiones ZUE que se inactiven, se sustituyen los bloques **17** (figura 2) por los bloques **15** (figura 2) de sección rectangular. En las regiones ZUE inactivas no se coloca minigel.

- 5 Para fundir los minigeles **20** (figura 1) se coloca el marco **16** (figura 1) sobre una placa de acrílico, teflón u otro material apropiado y se ubica el peine, o peines aislados. Con posterioridad, se vierte la agarosa, como se hace convencionalmente y se cubre con placas apropiadas.

- Para efectuar la electroforesis se colocan las muestras en los pocillos **21** de los minigeles **(20, figura 1)**, estos se colocan en la cámara **(1, figura 1)**, deslizando el marco **(16, figura 1)** por las ranuras **(4, figura 1)**. Las ZUE que no serán empleadas se ocluyen con los bloques **(15, figura 2)** y en las ZUE que se emplearán se colocan los bloques **(17, figuras 1 y 2)**. La cámara **(1, figura 1)** se llena con la solución tampón y los electrodos **(2, figura 1)** se energizan a través de la unidad de conmutación de los campos eléctricos mediante una fuente de poder. Para mantener la temperatura constante se recircula solución tampón fría. Las mangueras de entrada y salida para el enfriamiento de la solución tampón se colocan en las paredes frontales **(8 en la figura 1)** de la cámara **1**.

- La figura 3 muestra los 52 patrones de bandas **24** que brindaron los cromosomas de *S. cerevisiae* en los cuatro minigeles **(20 en la figura 1)** de la cámara **(1, figura 1)**. Esos patrones fueron obtenidos a 8,33 V/cm, 15 °C, en agarosa 1.5%, solución tampón TBE 0,5X, 12 horas de electroforesis y 80 segundos de duración de los pulsos eléctricos. Los minigeles fueron fundidos en el marco **(16 en la figura 1)** como se describió anteriormente. Con experimentos realizados en la cámara **(1, figura 1)**, empleando la solución tampón TBE 0,5X, 1.5% de Agarosa (Lachema), una, dos, tres o las cuatro regiones ZUE, y para altura constante de tampón, se obtuvo para la ecuación IV:

$$C(\text{vasija}) = a_0 + a_1 (d / L)^{0,1}$$

- Donde $a_0 = -0,786$ y $a_1 = 1,047$ y poseen varianzas de $1,451 \cdot 10^{-4}$ y $1,6949 \cdot 10^{-4}$ respectivamente. Ambos coeficientes difirieron significativamente de cero. Se obtuvo además para la ecuación VIII

$$Rp^{0,5} = -1.522 + Re \cdot 2.1096 \cdot 10^{-2} + 87.31/V_{DC} + \text{Temperature} \cdot 2.2697 \cdot 10^{-2}$$

Los coeficientes de las ecuaciones se determinaron con mediciones de ' V_{DC} ' e ' I_{DC} ' en las cámaras. Lo que permitió estimar ' I_0 ' y los valores máximos de E que pueden aplicarse en cámaras MultiMiniTAFE (Tabla 3). Los resultados están calculados para las fuentes de poder más empleadas en ECP. Este procedimiento se usó para seleccionar las dimensiones de las cámaras que fueron construidas. Como era de esperar, la polarización del electrolito ' I_0 ' no depende linealmente del campo.

Para la constante de agotamiento se obtuvo:

$$10 \quad k = -3,6365 \cdot 10^{-2} + \text{Campo} \cdot 1,6135 \cdot 10^{-2}$$

Tabla 3. Intensidades máximas de campo eléctrico ('E') que pueden aplicarse en cámaras multiminiTAFE de diferentes anchos, empleando varias fuentes de poder ECP.

| Fuente de Poder | Ancho cm | E volt/cm T= 10 °C | E volt/cm T =15 °C | E volt/cm T= 20 °C | E volt/cm T= 25 °C | E volt/cm T= 30 °C |
|----------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Imax=0,4 Vmax=500 Pmax=200 | 10 | 25,8 | 22,6 | 19,9 | 17,4 | 15,4 |
| | 20 | 17,4 | 15,4 | 13,5 | 11,9 | 10,6 |
| | 30 | 13,0 | 11,5 | 10,3 | 9,1 | 8,1 |
| | 40 | 10,3 | 9,1 | 8,1 | 7,2 | 6,4 |
| | 50 | 8,2 | 7,3 | 6,5 | 5,8 | 5,3 |
| Imax=1,0 Vmax=600 Pmax=300 | 10 | 49,6 | 46,4 | 43,5 | 40,8 | 37,9 |
| | 20 | 40,6 | 37,9 | 33,5 | 29,5 | 26,0 |
| | 30 | 32,3 | 28,6 | 25,3 | 22,3 | 19,9 |
| | 40 | 25,3 | 22,4 | 19,9 | 17,7 | 15,7 |
| | 50 | 20,3 | 17,9 | 15,9 | 14,2 | 12,6 |
| Imax=2,0 Vmax=300 Pmax=300 | 10 | 38,3 | 38,3 | 38,3 | 38,3 | 38,2 |
| | 20 | 38,3 | 38,2 | 35,8 | 33,6 | 31,7 |
| | 30 | 35,3 | 33,1 | 31,2 | 29,2 | 27,6 |
| | 40 | 31,2 | 29,3 | 27,6 | 26,0 | 24,5 |
| | 50 | 27,8 | 26,2 | 24,6 | 23,3 | 21,9 |

'E' se estimó con las ecuaciones II, III, IV y V. I_{max}: corriente máxima (en Amperes) de salida de la fuente, V_{max}: voltaje máximo (en volts) de salida de la fuente, P_{max}: potencia máxima (en Watt) de salida de la fuente. Los valores de 'E' se estimaron para el 85% de I_{max}, V_{max} y P_{max} de las fuentes de poder empleadas.

- 5 Por otro lado, de acuerdo con las ecuaciones ajustadas si se emplea una fuente de poder cuya salida máxima de potencia es 200 Watt y 0,4 A, se obtendrá que cuando se usan la cuatro cámaras, 20°C, los valores de 'E' cercanos a 10 V/cm requieren que la solución tampón se reemplace cada una hora, lo cual indica que cuando se emplean las cuatro regiones ZUE la cámara no es eficiente para esos valores de campo eléctrico. En el
- 10 ejemplo de la figura 3, los patrones de bandas de ADN cromosomales de *S. cerevisiae* contenidas en las 52 muestras se obtuvieron en solo 12 horas, pero fue necesario cambiar 1 L de solución tampón después de 7 horas de electroforesis. Ese tiempo coincide con lo predicho por las ecuaciones.
- 15 Puede diseñarse una variante de la cámara anterior que no emplee los bloques (17, figura 1) que eliminan las regiones ZNU. Sus ventajas y deficiencias son similares a la de la anterior, pero emplean mayor cantidad de reactivos, la corriente eléctrica y por tanto, la potencia que se genera en ellas es mayor. No obstante la solución tampón demora más tiempo en agotarse. También pueden diseñarse variantes de estas cámaras con
- 20 configuración TAFE invertida. El diseño de cámaras con electrodos ordenados en configuración TAFE invertida se muestra a continuación en el ejemplo de cámaras tipo II. De acuerdo con los principios anteriores se logra que sea variable la cantidad de ZUE que puede ser activada en este tipo de cámara, el número de minigeles que empleará en un experimento, y el volumen de reactivos ('Bnt') por experimento. También se logra
- 25 variabilidad en la cantidad máxima de muestras ('Nt') que pueden analizarse simultáneamente en una coelectroforesis.

Ejemplo 2. Cámaras con zonas útiles de electroforesis múltiples: multiminicámara TAFE tipo II.

30

Las figuras 4 - 7 muestran varias vistas de una cámara tipo II de 3 miniplataformas desmontables de electrodos.

La figura 4 muestra la **vista lateral en explosión de un corte de la cámara 34**, la miniplataforma desmontable de electrodos **25** y el marco **30** que sostiene al gel **31** y las muestras **36**. En la miniplataforma **25** los cátodos **26** están en el fondo de la cámara, mientras que los ánodos **27** están en la parte superior (configuración TAFE invertida). Las paredes exteriores **28** juegan el mismo papel que los bloques **17** de las cámaras tipo I (figuras 1 y 2), es decir, eliminan las regiones ZNU. En la parte central de la miniplataforma está presente la ranura **29** por donde se desliza el marco **30** que contiene el minigel **31** de esa miniplataforma. Las piezas **40** de las miniplataformas **25** contienen los conductos **41** por donde pasan las mangueras para la recirculación de la solución tampón en la cámara.

Se muestra además las paredes frontales **33** de la cámara **34** donde pueden colocarse opcionalmente las miniplataformas **25**. En la cámara **34**, las paredes de las miniplataformas **28** poseen una ranura **32** para comunicar toda la solución tampón que circula por la cubeta. Durante el montaje o desmontaje de las miniplataformas, las piezas **40** se deslizan por ranuras **35** hechas en las paredes frontales **33** de la cámara **34**.

La figura 5 muestra la vista superior de la cámara **34** con sus tres miniplataformas de electrodos **25** colocadas.

La figura 6 muestra una vista superior de la cámara **34** y de algunos detalles descritos en las figuras anteriores. En la vista se esquematiza que en la cámara solo se colocó una miniplataforma de electrodos **25**. Las dos regiones restantes, donde se podrían ubicar otras dos miniplataformas, se ocluyen con las piezas **42** que se construyen de un material de elevada constante dieléctrica.

La figura 7 muestra la vista superior de la tapa **55**, los conectores **43** y **45** y las conexiones eléctricas **44** y **46**. Los cátodos (**26** en la figura 4) de las tres miniplataformas se conectan en paralelo mediante los conectores **43** y las líneas eléctricas **44**, mientras que los ánodos (**27** en la figura 4) se conectan en paralelo mediante los conectores **45** y las líneas eléctricas **46**. De esta forma los electrodos de todas las miniplataformas adquieren continuidad. En esta cámara cada miniplataforma tiene su marco **30** para sostener el gel **31** (figura 4). Las muestras (**36** en la figura 4) se colocan en la parte inferior del gel, pues los electrodos están ordenados en configuración TAFE invertida.

Para llevar a cabo las electroforesis en esta cámara, primero se decide cuántas miniplataformas **25** (figura 4) se activarán y las restantes se ocluyen o inactivan con las piezas **42**. Se funden los minigeles **31** de manera similar a como se realiza en las

cámaras tipo I y se colocan las muestras. Después se colocan en las miniplataformas los marcos conteniendo los minigeles y muestras. Estos pueden depositarse en la cámara antes o después de añadir la solución tampón. Una vez concluido el proceso, se conecta la tapa y los electrodos se energizan a través de la unidad de conmutación de los campos eléctricos, la que se conecta a la fuente de poder.

Ejemplo 3. Cámaras con zonas útiles de electroforesis únicas: minicámara CHEF.

En la figura 8 se muestra un esquema de una mini-cámara de tipo CHEF. Dentro de un arreglo hexagonal de dieciocho electrodos **60** se coloca un gel **61** de agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz. El gel **61** se fija en su posición con soportes en forma de escuadra **62** pegados a una base **63** que se introduce en una depresión **69** del piso de la cámara. Dentro del gel **61** se colocan los bloques **64** del mismo material del gel conteniendo moléculas de ADN inmovilizadas de talla cromosómica. Los bloques **64** conteniendo las moléculas de ADN se colocan en posición tal que al ser sometidos a un campo eléctrico de determinada intensidad y que alterna su dirección de aplicación permite la separación de las moléculas de acuerdo con su talla en un patrón con bandas rectas y reproducibles entre las carrileras. La cámara se llena con una solución tampón para permitir la movilidad de las moléculas.

La temperatura, pH, concentración y otros parámetros de la solución deben mantenerse homogéneos en toda la cámara y constantes durante todo el proceso de separación electroforética de las moléculas. Por esta razón se mantiene un intercambio constante entre la solución de la cámara y un volumen extra que se coloca en un medio termostatado.

Para lograr la homogeneidad de la solución es importante que la recirculación de la misma se efectúe a un flujo elevado. La solución se añade a la cámara por la entrada **65** y se recoge por la salida **66**. Después de la entrada **65** y antes de la salida **66** se encuentra un sistema **67** para limitar la formación de turbulencias en la solución. En la figura se señalan dos láminas de tipo A **67** que se desensamblaron para que se pueda ver la lámina de tipo B en el fondo de la cámara. Las turbulencias en la solución afectan la homogeneidad del campo eléctrico en la cámara y provocan distorsión en los patrones de bandas.

En la tabla 4 se presentan algunas dimensiones físicas de mini-cámaras CHEF que no limitan el alcance de esta patente pero son ilustrativas de las cámaras que se desean proteger.

5

Tabla 4. Parámetros reales en algunas mini-cámaras de tipo CHEF.

| Cámara | MiniCHEF 1 | MiniCHEF 2 | MiniCHEF 3 |
|--|-------------|-----------------|-------------|
| Separación entre electrodos de polaridad opuesta (cm) | 11,6 | 6,2 | 11,6 |
| Cantidad de electrodos | 18 | 18 | 36 |
| Área de la base de la cámara (cm ²) incluyendo el limitador de turbulencias | 272 | 94 | 272 |
| Volumen de solución tampón en la cámara (mL) | 225 | 80 | 225 |
| Dimensiones del gel cuadrado (cm) | 4 x 4 x 0,5 | 2,2 x 2,2 x 0,2 | 4 x 4 x 0,5 |
| Dimensiones del gel rectangular (cm) | 7 x 4 x 0,5 | 3,6 x 2,2 x 0,2 | 7 x 4 x 0,5 |
| Cantidad de muestras de 0,15 cm de ancho en el gel rectangular | 27 | 13 | 27 |

Ejemplo 4. Cámaras con zonas útiles de electroforesis únicas: minicámara TAFE.

10

En la figura 9 se muestra un esquema de una mini-cámara de tipo TAFE de configuración de electrodos de tipo TAFE invertido. El gel **71** que es también de agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz se coloca verticalmente en medio de los dos electrodos positivos **72** y los dos negativos **73**. Los bloques **74** que contienen las moléculas de ADN se colocan en posición tal que al ser sometidos a un campo eléctrico de determinada intensidad y que alterna su dirección de aplicación permite la separación de las moléculas de acuerdo con su talla en un patrón de bandas recto. La cámara se llena con una solución tampón para permitir la movilidad de las moléculas. Para la recirculación de la solución, esta se añade a la cámara por la entrada **75** y se recoge por la salida **76**. Después de la entrada **75** y antes de la salida **76** se encuentra un sistema **77** para limitar la formación de turbulencias en la solución.

20

En la tabla 5 se presentan algunas dimensiones físicas de las mini-cámaras MiniTAFE que no limitan el alcance de esta patente pero ilustran las cámaras que se desean proteger.

5 Tabla 5. Parámetros reales en algunas mini-cámaras de tipo TAFE.

| Cámara | MiniTAFE 1 | MiniTAFE 2 |
|--|------------------|-----------------|
| Separación entre electrodos de polaridad opuesta (cm) | 7,8 | 10 |
| Área de la pared donde se fijan los electrodos (cm ²) incluyendo el limitador de turbulencias | 127,7 | 166,8 |
| Dimensiones de la cámara (cm) | 15,2 x 7,1 x 8,4 | 20,1 x 6 x 8,3 |
| Volumen de solución tampón (mL) | 530 | 800 |
| Dimensiones del gel (cm) | 7 x 4 x 0,5 | 6,3 x 5,2 x 0,4 |
| Cantidad de muestras de 0,15 cm de ancho | 27 | 24 |

Ejemplo 5. Parámetros eléctricos de algunas mini-cámaras de esta invención

La distancia entre los electrodos de polaridad opuesta que tienen estas cámaras (menor o igual a 15,0 cm) permite aplicar campos eléctricos de hasta 25 V/cm en el TAFE y 16 V/cm en el CHEF, cuando se llenan con TBE 0,5X (TBE 1X: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3), empleando fuentes de poder cuya salida de potencia máxima no excede 300 Watt y a voltajes menores a 375,0 V. La resistencia eléctrica de estas cámaras es de varios miles de Ohm, esto es debido al poco volumen de solución que se emplea. Por esta razón se pueden alcanzar intensidades de campo eléctrico elevadas utilizando fuentes de poca potencia máxima.

En la tabla 6 se muestran los parámetros eléctricos y el consumo de energía eléctrica de algunas cámaras como las que se presentan en esta invención. En este caso las mediciones se hicieron con los volúmenes de solución TBE 0,5X descritos en las tablas 4 y 5 a una temperatura de 20 °C.

20 Tabla 6. Parámetros eléctricos de las mini-cámaras CHEF y TAFE.

| Cámara | MiniCHEF 1 | | MiniTAFE 1 | |
|---------------------------------|------------|-------|------------|-------|
| Campo eléctrico aplicado (V/cm) | 10 | 16 | 8 | 20 |
| Voltaje aplicado (V) | 116,0 | 185,5 | 62,4 | 156,0 |
| Intensidad de Corriente (mA) | 85,0 | 139,9 | 63,4 | 168,0 |
| Potencia aplicada (Watt) | 9,8 | 26,0 | 4,0 | 26,2 |

Ejemplo 6. Forma de fijar los electrodos en las cámaras CHEF y TAFE

En la figura 10 se muestra la forma en que se fijan los electrodos de las mini-cámaras de tipo CHEF y en las mini y minimulticámaras TAFE en sus posiciones. Los electrodos son un alambre **81** de platino de diámetro aproximado 0,05 cm. Ellos son los que transmiten la energía eléctrica desde un circuito electrónico externo hacia la solución que se encuentra en el interior de las cámaras para establecer el campo eléctrico que provoca la migración y separación de las moléculas de ADN.

El fondo **82** de las cámaras de tipo CHEF y dos de los laterales **83** (los mismos que sostienen el gel) de las cámaras de tipo TAFE se perforan para permitir el paso del alambre de platino que formará el electrodo. Para mantener fijos los electrodos e impedir la fuga de solución por estos orificios se insertan los alambres **81** en la luz de un tapón elástico **84** u otro material muy flexible que se adapte perfectamente al orificio y al alambre **81** aunque este adelgace con el uso.

Ejemplo 7. Ejemplo de sistema para preparar geles con caras planas

Un elemento esencial para la obtención de patrones de bandas rectos y reproducibles en estas cámaras es la forma de los geles **61** y **71**. Las caras de estos deben ser perfectamente planas o se alteraría la homogeneidad del campo eléctrico en su interior y se distorsionaría el patrón. En la figura 11 se muestra la vista posterior de los accesorios que se emplean para preparar los geles **61** y **71**.

Los geles **61** y **71** se preparan sobre una base **91** de superficies planas y suficientemente grande como para contener un marco **92**. El espesor del marco **92** determinará el grosor del gel que se fundirá. Las dimensiones del espacio interior **93**, también de superficies planas, determinarán el ancho y el largo de los geles **61** y **71**.

En el perímetro exterior del marco **92** se encuentran las ranuras **94**. Las mismas se encuentran cerca y a la misma distancia de uno de los bordes del marco **92**. En las ranuras **94** se insertarán las patas **96** del peine **95** por lo que el ancho de las ranuras **94** es el mismo que el de las patas **96**. La profundidad de ambas ranuras **94** es la misma y de forma tal que la distancia entre las caras interiores de las ranuras **94** sea igual a la distancia entre los bordes interiores de las patas **96**.

El peine **95** tiene, además, dientes **97** cuyos grosores se afinan para que sus secciones transversales sean iguales a la de los bloques **64** y **74**. Los dientes **97** quedan hacia una de las caras del peine **95** y su longitud es igual al grosor del marco **92** menos 1,0 mm, por

detrás de los peines queda un escalón. Las patas **96** tienen esta misma longitud. En la figura 11 se muestra la ampliación de uno de los dientes **97** y donde se aprecia el escalón.

La tapa **100** es de caras planas y uno de sus bordes está rebajado en forma de cuña **101**, por lo que una de las caras planas es mayor que la otra. Se muestra la ampliación de una sección del borde en forma de cuña **101**. El ancho de la tapa **100**, al menos por el borde rebajado en forma de cuña **101**, es mayor que el ancho del espacio interior **93** del marco **92**.

La tapa **103** tiene también caras planas excepto por un borde donde tiene el saliente **104** de 0,1 cm de espesor. Se muestra la ampliación de una sección del saliente **104**. El ancho del saliente **104** es mayor que el del espacio interior **93** del marco **92** pero menor que la distancia entre las caras interiores de las patas **96**. El peine **105** es similar al peine **95** pero sus dientes **106** son 0,2 cm más cortos.

Para preparar el gel se coloca la base **91** sobre una superficie horizontal, sobre ella se pone el marco **92** con las muescas hacia atrás. El peine **95** se inserta en las ranuras **94** de forma que los dientes **97** queden hacia delante. Luego se pone la tapa **100** sobre el marco **92** y por delante del peine **95** con la cara plana mayor hacia abajo y el borde con la rebaja **101** en forma de cuña pegado al peine. Las flechas indican la dirección en que se ensamblan los accesorios. El conjunto se inmoviliza apretando el marco **92** contra la base **91** con ayuda de presillas u otro dispositivo. Por detrás del peine **95** se vierte la agarosa u otro material que al polimerizar forme una matriz. La temperatura de este líquido en el caso de la agarosa fundida es de 65 a 70 °C. Para otros materiales puede variar la temperatura a que se vierte. El volumen de gel fundido a añadir debe ser suficiente para llenar la cavidad que queda entre la base **91**, las paredes del espacio **93** del marco **92** y la tapa **100** y que se forme un menisco detrás del peine **95**. Luego se coloca la tapa **103** con la cara plana hacia abajo y el borde saliente **104** pegado al peine **105** por detrás, esto elimina el volumen de gel fundido sobrante. Todo el conjunto se deja reposar hasta que el material solidifique.

Cuando el gel **61** ó **71** se haya formado se retira el peine **95** y se colocan los bloques **64** ó **74** en los pocillos **107** formados al retirar los dientes **97**. Como la sección transversal de los dientes **97** es igual a la de los bloques **64** y **74** estos quedan uniformemente colocados a todo lo ancho y a la misma distancia del borde del gel **61** ó **71**. Cuando se han colocado todos los bloques **64** y **74** que se deseen, se empujan hacia adentro del gel **61** ó **71** con

ayuda del peine **105** y entonces quedan también a la misma profundidad.

Al utilizar adecuadamente los accesorios descritos se preparan geles de caras perfectamente planas y los bloques con las moléculas de ADN inmovilizadas quedan perfectamente alineados. Esta es una de las condiciones necesarias para obtener patrones de bandas rectos y repetitivos.

Ejemplo 8. Tipos de geles de las mini-cámaras CHEF. Forma de colocarlos en las mini-cámaras.

En las mini-cámaras de tipo CHEF se puede colocar geles de diferentes tamaños. Para fijar el gel **61** (figura 12) en una posición fija durante la electroforesis se utiliza una base **63** rectangular de plástico o acrílico. Sobre la base **63** se colocan cuatro piezas **62** en forma de escuadra. Las escuadras **62** se colocan de forma que rodeen las cuatro esquinas de un rectángulo o cuadrado donde se colocará el gel **61**. La distancia entre las caras interiores de las escuadras **62** es igual a las dimensiones (largo y ancho) del gel **61** que se colocará. La altura de las escuadras **62** no debe ser mayor de 0,2 cm para que no se conviertan en obstáculos que deformen el campo eléctrico que se establece en la cámara.

La base **63** se coloca en el fondo de la cámara en el centro de los electrodos **60**. En esta zona de la cámara se encuentra una depresión **69** con forma rectangular y con las mismas dimensiones de la base **63**. La profundidad de la depresión **69** es igual al espesor de la base **63** para que el gel **61** quede a nivel con el resto del piso de la cámara. La base **63** tiene algunas rebajas **111** en las bordes y las esquinas para facilitar su extracción cuando termina el experimento. Todas las bases **63** son idénticas excepto por la posición de las escuadras **62**. De esta forma se pueden utilizar geles **61** de diferente tamaño en la misma cámara. Es importante que todo el sistema garantice que el gel **61** quede perfectamente centrado durante las electroforesis para obtener los patrones electroforéticos rectos y reproducibles.

Al realizar una electroforesis se toma el gel **61** con los bloques **64** que contienen las moléculas de ADN colocados (preparado con ayuda de los accesorios descritos en el ejemplo 7) y se coloca sobre la base **63** entre las cuatro escuadras **62**. Luego se toma la base **63** con el gel **61** encima y se coloca en la depresión **69** del fondo de la cámara. Es importante que los bloques **64** queden hacia la zona donde se encuentran los cátodos puesto que las moléculas de ADN en solución y a pH neutro se cargan negativamente y

migran hacia los ánodos. Cuando se termina la electroforesis el gel **61** se extrae para teñirlo y visualizar el patrón de bandas. Si se desea utilizar un gel **61** de diferente tamaño o limpiar la cámara se extrae la base **63** introduciendo un palillo en las rebajas **111** de la base **63** y haciendo palanca.

5

Ejemplo 9. Sistema para tensar los electrodos de las mini-cámaras TAFE.

Los electrodos de las mini-cámaras TAFE pueden distenderse con el uso. En la figura 13 se muestra un dispositivo para tensar los alambres de platino **81** que forman los electrodos. El vástago **115** tiene una rebaja en forma de cintura **116** en la que se perfora un orificio **117** de diámetro ligeramente superior al del alambre de platino **81**. El alambre **81** se introduce por el orificio **117** y se hace girar el vástago **115** con ayuda de un destornillador a través de la ranura **118** hasta tensar el alambre **81**. Para fijar la posición del vástago **115** se utiliza un prisionero **119** que se afloja antes de tensar el alambre **81** y se aprieta luego.

15

Ejemplo 10. Sistema limitador de turbulencias en las mini-cámaras CHEF

Las mini-cámaras de tipo CHEF poseen un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución, permitiendo así la recirculación de la solución a flujos altos.

En la figura 14 se muestra en detalle el sistema que limita la formación de turbulencias en la solución para las cámaras de tipo CHEF. El mismo está formado por láminas impermeables de tipo A **121** y de tipo B **122** de un material de elevada constante dieléctrica para no afectar el campo eléctrico aplicado.

Las láminas de tipo A **121** son más altas y se colocan despegadas del piso de la cámara de forma que la solución no pueda nunca desbordarse por encima de ellas sino que siempre pase por debajo. Las láminas de tipo B **122** son más bajas, se pegan al piso de la cámara y su altura es siempre mayor que la separación entre las láminas de tipo A **121** y el piso de la cámara.

Las láminas de tipo A **121** y de tipo B **122** se colocan alternadamente comenzando y terminado con una lámina de tipo A **121** y colocando entre ellas láminas del tipo B **122**. Los conjuntos de láminas de tipo A **121** y de tipo B **122** se colocan después de la entrada **65** y antes de la salida **66** y se puede poner tantas láminas de tipo A **121** y de tipo B **122** como se desee hasta 1,0 cm de distancia de los electrodos.

La solución es inyectada por la entrada **65** y pasa alternadamente por debajo de las

láminas de tipo A **121** y por encima de las láminas de tipo B **122**. Esta trayectoria sesgada (indicada por las flechas) va amortiguando los cambios de presión que se producen en la inyección de forma tal que al pasar por encima del gel **61** el flujo de solución es casi constante y no posee turbulencias.

- 5 En el otro extremo de la cámara donde se recoge la solución por la salida **66** ocurre el mismo proceso.

Ejemplo 11. Sistema limitador de turbulencias de las cámaras TAFE

- 10 Las cámaras de tipo TAFE con ZUE únicas o múltiples también poseen un sistema que limita la formación de turbulencias en la solución, permitiendo así la recirculación de la solución a flujos altos.

En la figura 15 se muestran detalles del sistema de limitación de turbulencia en la solución de las mini-cámaras de tipo TAFE con ZUE única.

- 15 El sistema está formado por láminas impermeables **131** de material de elevada constante dieléctrica que ocluye totalmente el paso de la solución que se inyecta por la entrada **75** y se recoge por la salida **76** excepto por las ranuras **132**. Las variaciones de presión que se producen en la solución al ser inyectadas y extraídas de la cámara son amortiguadas en las cavidades **133** y al pasar por la zona donde está el gel **71** el flujo de la solución es casi constante y no provoca turbulencias. Las flechas indican la trayectoria que sigue el
20 tampón desde que se inyecta por la entrada **75** hasta que se recoge por la salida **76**.

- El flujo máximo que puede aplicarse a estas cámaras sin que se formen turbulencias en la solución de forma apreciable varía con el tamaño y volumen de las cámaras. En la tabla 7 se muestra el flujo máximo que pudo ser alcanzado en algunas de las cámaras como las que se presentan en los ejemplos 3 y 4 sin que se formaran turbulencias apreciables en la
25 solución.

Tabla 7. Flujo máximo de recirculación de la solución tampón en las mini-cámaras de ECP sin que se formen turbulencias en la solución.

| Cámara | Volumen (mL) | Flujo máximo sin turbulencias (mL/minuto). | Tiempo de recambio de la solución (minutos). |
|------------|-----------------|---|---|
| MiniCHEF 1 | 225 | 100 | 2,25 |
| MiniTAFE 1 | 530 | 280 | 1,89 |
| MiniCHEF 2 | 80 | 44 | 1,82 |

Tiempo de recambio de la solución se refiere al tiempo que se necesita para cambiar todo el volumen de la solución en la cámara.

Ejemplo 12. Sistema para preparar los bloques de muestras.

- 5 Como ya se mencionó es imprescindible disponer de bloques de muestras idénticos en formas, dimensiones y concentración de ADN para obtener reproducibilidad en los patrones de bandas. Esos bloques a su vez deben poseer dimensiones y formas similares a la de los pozos formados en el gel de electroforesis.
- En la figura 16 se muestra uno de los sistemas diseñados para obtener bloques con las
- 10 características mencionadas en el párrafo anterior. El sistema está compuesto por el aplicador **141**, el manipulador **142**, el formador de bloques **143**, su tapa **144** y el cortador de bloques **145**.
- En el ejemplo, el formador de bloques **143** es una lámina rectangular (7 x 6,9 x 1 cm longitud x ancho x espesor) de acrílico, goma o silicona con caras planas y pulidas; una
- 15 de las caras de mayor área tiene once ranuras superficiales **146** que son rectangulares y paralelas. Ellas están espaciadas a todo lo ancho, de tal forma, que el ancho de la ranura coincide con el alto del bloque de muestra **148** y la profundidad de la ranura **146** coincide con el grosor de los bloques de muestras **148**.
- Sobre la cara ranurada del formador de bloques **143** se coloca la tapa **144**, la cual es otra
- 20 lámina rígida de acrílico o vidrio completamente plana. Ambas partes, **143** y **144** se mantienen unidas para garantizar la hermeticidad entre los canales de fundición que forman las ranuras **146**. Con la ayuda de una pipeta se rellenan las ranuras con una suspensión de células en agarosa apoyando la punta de la pipeta en el extremo de cada uno de los canales de fundición. La mezcla se vierte con cuidado de llenarlos
- 25 completamente y se deja en reposo el sistema hasta que la agarosa solidifique.
- La tapa **144** se retira, deslizándola transversalmente a las ranuras **146** para no arrastrar las tiras **147** de la agarosa solidificada. Las tiras **147** se cortan en pequeños bloques **148** con el cortador **145**. Para ello se apoya el filo de los dientes **149** perpendicularmente y sin corrimientos contra la cara inferior de cada ranura **146**. La distancia entre los dientes del
- 30 cortador definen el ancho de los bloques **148**, de esta forma se garantiza que todos los bloques **148** que contienen las muestras de ADN queden con la misma forma y dimensiones.

Una vez cortados los bloques **148**, el aplicador **141** se usa para arrastrarlos por las ranuras **146** y así dejarlos caer en los recipientes que contienen las soluciones de tratamiento de las células. El aplicador **141** también sirve para colocar los bloques **148** en los pocillos **107** (figura 11) del gel de electroforesis. El manipulador **142** se utiliza para
5 extraer los bloques del recipiente donde se tratan para la preparación de las moléculas de ADN o del frasco donde se almacenan para su conservación.

Ejemplo 13: Patrones de bandas de los cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* separados en una mini-cámara TAFE (con una ZUE única).

- 10 En la figura 17 se muestra un ejemplo de electroforesis en una mini-cámara TAFE de 7,8 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas. Esa mini-cámara emplea un gel **151** de 7,0 cm de ancho y 4,0 cm de largo. En el gel **151** fueron depositados trece bloques **152** de 0,25 cm de ancho, 0,07 cm de grosor y 0,2 cm de profundidad. Los bloques **152** contenían los cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae*, los que
15 fueron separados durante la electroforesis en los patrones de bandas **153** en cada una de las carrileras **154** del gel. Cada patrón de bandas posee once bandas. Las condiciones de electroforesis fueron 60,0 segundos de tiempo de pulso, 7,0 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5X, 20 °C, 10,0 V/cm. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio.
- 20 Estos resultados indican que la mini-cámara TAFE brinda rápidamente buena separación de las bandas en el patrón electroforético y resultados reproducibles en las diferentes carrileras del gel.

Ejemplo 14: Reproducibilidad de los patrones de bandas obtenidos en mini-cámaras CHEF.

- 25 En la figura 18 se muestran los resultados de tres corridas electroforéticas en una mini-cámara CHEF de 11,6 cm de distancia entre los electrodos de polaridades opuestas. Esa cámara emplea geles cuadrados **161**, **162** y **163** de 4,0 cm de lado. En los geles **161**, **162** y **163** fueron depositados siete bloques **164**, **165** y **166** de 0,25 cm de ancho, 0,07 cm de grosor y 0,2 cm de profundidad. Los bloques **164**, **165** y **166** contenían los cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae*, los que fueron separados durante la electroforesis en los patrones de bandas **168**, **169** y **170** en cada una de las carrileras **171**, **172** y **173** de
30 los tres geles **161**, **162** y **163**. Las condiciones de electroforesis fueron 50,0 segundos de

tiempo de pulso, 3,5 horas de electroforesis, agarosa 1,5%, TBE 0,5X, 20 °C, 9,82 V/cm. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio.

En la figura puede observarse que los patrones separados en cada gel **161**, **162** y **163** poseen igual cantidad de bandas en todas las carrileras. Además, cada banda **168**, **169** y **170** migró la misma distancia en las siete carrileras **171**, **172** y **173** de un gel **161**, **162** y **163** cualquiera. Por otro lado, en cada carrilera **171**, **172** y **173** de los tres geles **161**, **162** y **163** se aprecia el mismo patrón electroforético, el que posee igual número de bandas **168**, **169** y **170**, indicando que la mini-cámara brindó resultados reproducibles en experimentos diferentes, los que se obtuvieron en un tiempo breve de 3,5 horas.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1-3. Esquemas de cámaras TAFE tipo I y patrones electroforéticos.

Figura 1. Vista en explosión del esquema tridimensional de una cámara TAFE tipo I con su arreglo de electrodos en configuración TAFE convencional, las ranuras por donde se desliza el marco, que contiene todos los minigeles de las cuatro ZUE de la cámara y las muestras. También se muestran esquemas tridimensionales del marco, los minigeles y la tapa con los bloques que eliminan las regiones ZNU o eliminan regiones ZUE.

Figura 2. Vista lateral de una cámara TAFE tipo I, de los bloques que eliminan las regiones ZNU, del ordenamiento de electrodos en configuración TAFE convencional y del bloque que ocluye las regiones ZUE que no se emplearán en una electroforesis.

Figura 3. Patrones de bandas que brindaron los cromosomas de *S. cerevisiae* cuando fueron separados en los cuatro minigeles que emplea la cámara TAFE tipo I de la figura 1. Las moléculas fueron separadas a 8,33 V/cm, 15 °C, durante 12 horas de electroforesis en 1,5 % de agarosa, y solución tampón TBE 0,5X y para 80 segundos de duración de los pulsos eléctricos. A las 7 horas se reemplazó un litro de solución tampón.

Figuras 4-7. Esquemas de las características distintivas de las cámaras TAFE tipo II.

Figura 4. Vista en explosión de un corte lateral de la cámara TAFE tipo II, una de sus miniplataformas de electrodos en configuración TAFE invertida con su marco y su gel y la ubicación de las muestras en la parte inferior del gel. Las miniplataformas de electrodos son desmontables.

Figura 5. Vista en planta de la parte superior de la cámara de 3 miniplataformas de electrodos en la cual se han colocado las tres miniplataformas.

- 16- Tanto las cámaras TAFE tipo I como tipo II pueden emplear menos volumen de solución tampón, ya que pueden eliminarse las regiones ZNU por donde pasan las líneas de fuerza del campo eléctrico que no actúan sobre el movimiento de las moléculas.
- 5 17- Las cámaras con los electrodos dispuestos en configuración TAFE invertida son simples de construir y facilitan la manipulación de los minigeles durante los experimentos.
- 18-Los minigeles de las cámaras TAFE tipo I y II emplean muestras delgadas, por lo que ahorran reactivos biológicos y reducen el tiempo de electroforesis.
- 10 19-Las cámaras con múltiples ZUE son útiles para realizar estudios de epidemiología molecular, análisis de ceparios, analizar clonajes en vectores YAC y BAC y cualquier otra aplicación que involucre gran cantidad de muestras

REIVINDICACIONES.

- 1- Cámaras de electroforesis de campos pulsantes de tipo TAFE (Transversal alternating Field Electrophoresis) o CHEF (Contour Clamped Homogeneous Electric Field) para la separación de moléculas de ADN, donde se emplea un sistema para energizar los electrodos en las cámaras y alternar la dirección de aplicación de los campos eléctricos así como un sistema para recircular el tampón, caracterizada porque,
- i) poseen una o múltiples zonas útiles de electroforesis que portan un minigel cada una,
 - ii) sus dimensiones y el número de muestras que pueden analizar dependen de la distancia 'd' que separa los pares de electrodos de polaridad opuesta, la cual puede estar comprendida entre 6,2 y 15 cm, y de las cantidades y tamaños de las zonas útiles de electroforesis,
 - iii) no poseen zonas no útiles de electroforesis, (las zonas no útiles de electroforesis pueden ser excluidas de la cámara mediante el empleo de materiales de elevada constante dieléctrica),
 - iv) poseen electrodos que se mantienen tensos por la acción de un sistema de fijación en el CHEF y uno de fijación y de tensión en las de tipo TAFE,
 - v) las cámaras de tipo TAFE pueden ser de configuración TAFE invertida.
- 2- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las cámaras de tipo CHEF poseen una zona útil de electroforesis única que puede portar un minigel rectangular o un gel cuadrado.
- 3- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 2 caracterizada porque las dimensiones del minigel rectangular que se emplea en las cámaras de tipo CHEF son $d/3$ centímetros de longitud y $d/1,732$ centímetros de ancho 'a', estando comprendidos el ancho entre 3,6 y 8,7 cm y la longitud entre 2,1 y 5 cm.
- 4- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 2 caracterizada porque la longitud y el ancho 'a' del minigel cuadrado que se emplea en las cámaras de tipo CHEF es de $d/3$ centímetros y están comprendidas entre 2,1 y 5 cm.

- 5- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque de la cámara CHEF fueron excluidas las zonas no útiles de electroforesis de tal forma que las bases de las cámaras poseen un área en centímetros cuadrados que se calcula a partir de 'd' según la fórmula $[2+(d/0,87)] \cdot [6+d]$, donde los valores de las áreas están comprendidos entre 111,3 y 404,1 cm².
- 6- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque en las cámaras de tipo TAFE su ancho 'L' o dimensión paralela a los cátodos y ánodos es de hasta 50 cm, cámaras que en esa misma dimensión pueden estar subdivididas en dos o más zonas útiles de electroforesis (ZUE) las que portan un minigel cada una.
- 7- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque la longitud del minigel o de los minigeles que se emplean en las cámaras de tipo TAFE es $d \cdot 0,515$ centímetros, estando los valores comprendidos entre 3,2 y 7,7 cm.
- 8- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque emplea minigeles de ancho 'a' en los que se puede analizar en una corrida una cantidad máxima de muestras que se calcula de acuerdo con la relación $(a - 0,2) / 0,25$.
- 9- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque de las cámaras TAFE fueron excluidas las zonas no útiles de electroforesis de tal forma que las paredes laterales que soportan el gel y los electrodos en las cámaras TAFE tienen un área en centímetros cuadrados que se calcula a partir de 'd' según la fórmula $[2+1,4 \cdot d] \cdot [2+0,54 \cdot d] - 1,02 \cdot [1+0,54 \cdot d]^2$, donde los valores de las áreas están comprendidos entre 37,8 y 147,8 cm².
- 10- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque en las cámaras de tipo TAFE las ZUE se forman subdividiendo la cámara en partes iguales en la dirección de los electrodos de tal forma que los minigeles queden colocados secuencialmente uno al lado del otro.
- 11- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las cámaras TAFE pueden ser de tipo I o de tipo II.

12- Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 11 caracterizada porque en las cámaras TAFE de tipo I las ZUE están colocadas en una plataforma fija o desmontable única que posee electrodos continuos y de largo 'L'.

5

13- Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 1, 11 y 12 caracterizada porque en las cámaras TAFE de tipo I los minigeles se colocan en un soporte único en forma de marco o de manera independiente en cada una de las ZUE para lo cual la cámara debe poseer en su centro piezas ranuradas lateralmente por donde se deslizan dichos minigeles.

10

14- Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 11 caracterizada porque en las cámaras TAFE de tipo II las ZUE se ubican en miniplataformas independientes fijas o desmontables que poseen electrodos y un minigel cada una, donde los arreglos de electrodos están físicamente aislados unos de otros, pueden ser conectados entre sí en paralelo y adquirir continuidad para que al energizarlos con una sola fuente de poder todas las muestras depositadas en todos los minigeles de todas las plataformas estén sometidas a las mismas condiciones de electroforesis.

15

15- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque en las cámaras TAFE se activan solamente el número mínimo de ZUE necesarias para contener todas las muestras que serán analizadas y las que no son empleadas se eliminan de la electroforesis mediante inactivación y oclusión con piezas de la forma apropiada que están compuestas por un material de alta constante dieléctrica y donde el número de ZUE activas puede variar desde 1 hasta el número máximo de ZUE.

20

25

16- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque el número de ZUE en las que se pueden subdividir las cámaras TAFE está comprendido entre 1 y 30.

30

17- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las cámaras TAFE pueden ser del tipo TAFE invertido en las que los cátodos de las miniplataformas de electrodos se ubican en el fondo de la cámara de electroforesis,

los ánodos en su parte superior, y la región de los minigeles que contienen las muestras en la parte inferior de la cámara, con lo que las muestras depositadas en los minigeles migran en el sentido contrario al de la fuerza de gravedad.

5 18- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque en las cámaras TAFE se excluyen de la corrida electroforética las ZNU, exclusión que se realiza ya sea mediante la oclusión de partes de la cámara con materiales de constante dieléctrica elevada, o construyendo las cámaras con las paredes exteriores que no sostienen los electrodos situadas paralelamente y a una distancia no mayor de 2
10 centímetros del plano imaginario que contiene al cátodo de un campo eléctrico y al ánodo del otro campo eléctrico.

19.- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque los electrodos que se mantienen fijos por la acción de un sistema de fijación en las
15 cámaras de tipo CHEF y TAFE provienen del exterior de la cámara, se energizan con una fuente externa de poder durante el proceso de electroforesis y se ponen en contacto con la solución tampón atravesando la luz de tapones elásticos que se insertan en orificios horadados en las bases de las cámaras de tipo CHEF o en las paredes que sostienen al gel de las cámaras de tipo TAFE, tapones que sirven para fijar dichos electrodos a la
20 cámara.

20.- Cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 1 y 19 caracterizada porque los tapones elásticos donde pasan los electrodos para comunicarse con el exterior pueden ser de silicona, goma u otro material elástico cualquiera.
25

21.- Cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 1 caracterizada porque las cámaras de tipo TAFE poseen un sistema de tensión de los electrodos que atraviesan las paredes de dicha cámara el cual es colocado a la salida de cada electrodo de la cámara y que consiste en:
30 i) un vástago ranurado en su parte superior, vástago que gira y posee una muesca en forma de cintura, la que está atravesada por un orificio,
ii) orificio por donde se inserta el extremo de un electrodo y se dobla para que rodee la cintura del vástago,

iii) un prisionero que inmoviliza definitivamente al vástago en la posición deseada.

22.- Accesorios para cámaras de electroforesis de campos pulsantes caracterizados por estar compuestos por:

- 5 i) un sistema desarmable para limitar la formación de turbulencias en la solución tampón,
- ii) un sistema desarmable para formar geles de electroforesis de caras planas sin irregularidades ni meniscos entre los pocillos donde serán colocados los bloques de muestras, pocillos que son impresos en el gel por piezas en forma de peine, 10 donde cada una tiene varios dientes iguales, existiendo varios juegos de peines que difieren entre sí en los anchos y espesores de sus dientes,
- iii) un sistema desarmable para formar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados, el 15 cual posee varios formadores diferentes.

23.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 22 caracterizados porque en las cámaras de tipo CHEF el sistema desarmable para limitar la formación de turbulencias en la solución tampón posee dos tipos de láminas rectangulares, tipo A y tipo B hechas de un material de elevada constante dieléctrica y 20 que son del ancho del interior de la cámara, siendo las de tipo A de al menos 2 cm de altura y las de tipo B de 0,5 cm de altura.

24.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 22 y 23 caracterizados porque las láminas de tipo A se encuentran despegadas de la 25 base de la cámara a una distancia entre 0,02 y 0,05 cm y sobresalen de la solución tampón que se deposita en la cámara de tal forma que al recircular el tampón por el interior de la cámara este fluye solamente entre las láminas de tipo A y la base de la cámara.

30 25.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 22 y 23 caracterizados porque las láminas de tipo B están pegadas a la base de la cámara y sumergidas totalmente en la solución tampón de tal forma que al recircular el tampón en la cámara este fluye solamente por encima de las láminas de tipo B.

- 26.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 22 y 23 caracterizados porque ambos tipos de láminas se ubican en la entrada y en la salida de la solución tampón de la cámara, desde la pared de entrada o de salida de las mangueras hacia el interior de la cámara de electroforesis en el siguiente orden: lámina de tipo A después lámina de tipo B, repitiendo 'n' veces ese par de láminas, donde 'n' es un valor entero entre 1 y 4 y quedando la última lámina aproximadamente a 1 cm de los electrodos y siendo dicha última lámina de tipo A.
- 27.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 22 caracterizados porque para cámaras de tipo TAFE los accesorios para limitar la formación de turbulencias de la solución tampón están conformados por dos láminas hechas de un material de elevada constante dieléctrica iguales entre sí y del mismo tamaño de las paredes de la cámara, ubicadas en paralelo al plano que contiene a los electrodos de un mismo lado y que poseen una ranura horizontal en su tercio inferior, siendo el largo de la ranura igual al ancho de la cámara y de hasta 0,5 cm de altura.
- 28.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 22 y 27 caracterizados porque las láminas para limitar la formación de turbulencia en las cámaras TAFE se ubican una de ellas en la entrada de la solución tampón y la otra en la salida de dicha solución, dividiendo la cámara en tres compartimentos: uno central que contiene a las ZUE, y otros dos laterales por los que entra o sale el tampón.
- 29.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 22 caracterizados porque el sistema desarmable para formar geles de caras planas está formado por;
- una base plana,
 - dos marcos de 0,35 a 0,5 cm de espesor, donde uno de ellos posee una cavidad de forma rectangular y el otro una cavidad cuadrada y ambos poseen dos muescas para colocar un peine de dientes largos, y donde el espesor de los marcos y las dimensiones internas de las cavidades determinan el ancho 'a', la longitud y el espesor del gel que se va a utilizar como matriz de soporte en la electroforesis en las cámaras CHEF o TAFE,

- iii) un peine de dientes largos donde las dimensiones de los dientes determinan las dimensiones de los pocillos donde se depositan los bloques de muestras,
- iv) dos tapas, una tapa 1 que encaja en la parte delantera del peine y una tapa 2 que encaja en la parte trasera del peine,
- 5 v) un segundo peine similar al anterior pero de dientes cortos para empujar y alinear los bloques de muestras que se depositaron en los pocillos del gel.

30.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 22 y 29 caracterizados porque el peine de dientes largos en su parte anterior es liso mientras que en su parte posterior y por encima de los dientes está engrosado formándose un escalón, siendo dichos dientes iguales y cuyas dimensiones son: espesor entre 0,03 y 0,1 cm, ancho entre 0,15 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm, y longitud igual al espesor del gel menos 0,1 cm.

15 31.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con las reivindicaciones No. 22 y 29 caracterizados porque el peine de dientes cortos posee la misma forma y dimensiones que el de dientes largos excepto que la longitud de los dientes es 0,2 cm menor.

20 32.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 29 caracterizados porque la tapa 2 o tapa que encaja en la parte trasera del peine posee dos caras planas y en uno de sus bordes tiene un reborde saliente y la tapa 1 o tapa que encaja en la parte delantera del peine tiene una cara plana y la otra también plana pero rebajada en forma de cuña en uno de sus extremos.

25

33.- Accesorios para cámaras de electroforesis de acuerdo con la reivindicación No. 22 caracterizados porque el sistema desarmable para formar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados consta de:

- 30 i) varios formadores de bloques de muestras que consisten cada uno en una lámina plana de un material impermeable con espesor mayor de 0,5 cm la que posee múltiples ranuras paralelas a todo su largo, donde el ancho de cada ranura es de 0,2 cm, su profundidad es del espesor de los dientes de un juego de peines dado,

la que puede ser entre 0,03 y 0,1 cm, existiendo formadores para todos los posibles espesores de los dientes de todos los peines de dientes largos que pueden emplearse para imprimir los pocillos en el gel,

- ii) otra lámina plana y rígida de material impermeable de al menos 0,1 cm de espesor que actúa como tapa de los formadores de bloques de muestras,
- iii) varios cortadores de bloques de muestras, donde cada uno es una barra tan o más larga que las ranuras del formador de bloques de muestras y posee patas en sus extremos lo que le confiere la forma de una 'U' invertida, cortadores que tienen en su parte inferior varias protuberancias en forma de cuchillas que son transversales a su longitud mayor y cuyo borde afilado sobresale más de 0,1 cm hacia abajo y posee una longitud de 0,2 cm, estando las protuberancias o cuchillas de cada cortador separadas una distancia específica que puede ser entre 0,15 cm y el ancho del gel menos 0,3 cm.

34.- Procedimientos para el empleo de las cámaras y accesorios de electroforesis de campos pulsantes para la separación de moléculas de ADN donde las cámaras se conectan a través de mangueras con un sistema que recircula la solución tampón entre un intercambiador de calor externo y dichas cámaras, y se emplea un sistema para energizar los electrodos en las cámaras y alternar la dirección de aplicación de los campos eléctricos, caracterizado porque dicho método de empleo incluye:

- I. un método de empleo del sistema desarmable para preparar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados,
- II. un método de empleo del sistema desarmable para formar geles de caras planas,
- III. un método de empleo de las cámaras y accesorios para llevar a cabo el proceso de electroforesis,
- IV. un método de tensar los electrodos en las cámaras de tipo TAFE.

35.- Método de empleo de acuerdo con la reivindicación No. 34 caracterizado porque para utilizar el sistema desarmable para preparar bloques de muestras de dimensiones homogéneas y similares a las de los pocillos del gel donde serán depositados, se realizan los siguiente pasos:

- i) se prepara una suspensión de células en gel de agarosa que se mantiene a 45°C y se ambienta el formador de bloques de muestras y su tapa a 45°C,
- ii) se vierte dicha suspensión en las ranuras del formador de bloques de muestras,
- iii) se cubre el formador de bloques de muestras con su tapa y se coloca a temperatura ambiente o en frío,
- iv) se espera a que solidifique la suspensión de células en gel de agarosa,
- v) una vez solidificado el gel se coloca el cortador de bloques de muestras a lo largo de la primera ranura, con sus cuchillas hacia abajo y con los bordes afilados transversales a la dimensión mayor de la ranura,
- vi) se presiona hacia abajo el cortador de bloques de muestras y luego se retira,
- vii) se inclina el formador de bloques de muestras y se empujan los bloques de muestras hacia el interior de un recipiente que contiene una solución para su tratamiento,
- viii) se repite el proceso con las tiras de agarosa que solidificaron en todas las ranuras del formador de bloques de muestras.

36.- Método de empleo de acuerdo con la reivindicación No. 34 caracterizado porque para utilizar el sistema desarmable para formar geles de caras planas se llevan a cabo los siguientes pasos:

- i) se coloca el marco sobre la base plana,
- ii) se encajan las patas del peine de dientes largos en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior, quedando los dientes separados 0,1 cm de la superficie superior de la base plana,
- iii) la tapa 1 o tapa que encaja en la parte delantera del peine, se coloca sobre el marco y por delante del peine de dientes largos, con la cara plana volteada hacia el marco, la cara rebajada hacia arriba y la rebaja en forma de cuña pegada al peine de dientes largos,
- iv) el sistema ensamblado hasta el paso iii) se inmoviliza apretando contra el marco hasta que la cavidad que se forma entre ellos quede sellada excepto en su parte superior por detrás del peine de dientes largos,
- v) el gel fundido a una temperatura entre 65 y 70°C se vierte por detrás del peine de dientes largos hasta llenar la cavidad que se forma entre el marco y la base plana y la tapa 1 o tapa que encaja en la parte delantera del peine

- vi) la tapa 2 o tapa que encaja en la parte trasera del peine se coloca sobre el marco, por detrás del peine de dientes largos, introduciendo el reborde saliente en el escalón del peine de dientes largos, con lo que se evacua el gel fundido sobrante, se inmoviliza y se deja el sistema en reposo hasta que dicho gel solidifique,
- 5 vii) se retira el peine de dientes largos con lo cual quedan impresos los pocillos del ancho y espesor deseados,
- viii) se colocan los bloques de muestras sobre la rebaja en forma de cuña de la tapa 1, y se hacen resbalar hacia los pocillos, empujándolos con un aplicador cualquiera,
- 10 ix) una vez colocados dentro de los pocillos del gel, dichos bloques de muestras se empujan hacia el fondo de dichos pocillos con la ayuda del peine de dientes cortos, lo cual se hace encajando sus patas en las muescas que posee el marco en su perímetro exterior,
- x) se retira la tapa 1, o tapa que encaja en la parte delantera del peine, la tapa 2, o tapa que encaja en la parte trasera del peine y el marco.

15

37.- Método de empleo de acuerdo con la reivindicación No. 34 caracterizado porque para llevar a cabo el proceso de electroforesis a un número 'x' de muestras, si la cámara posee múltiples ZUE, es necesario realizar los siguientes pasos:

- 20 i) se define el número mínimo de ZUE que es capaz de contener las 'x' muestras,
- ii) se ocluyen en la cámara las ZUE que no serán utilizadas empleando piezas de un material de alta constante dieléctrica y de la forma apropiada,
- iii) en las cámaras TAFE tipo II se conectan en paralelo los electrodos de las ZUE que serán utilizadas.

25 38.- Método de empleo de acuerdo con la reivindicación No. 34 caracterizado porque para llevar a cabo el proceso de electroforesis, una vez preparado el minigel o los minigeles de caras planas con las dimensiones deseadas, es necesario realizar los siguientes pasos:

- i) se conecta la cámara a los dispositivos de alternar los campos eléctricos y energizar los electrodos,
- 30 ii) se llena la cámara con solución tampón TBE 0.5X (TBE 1X: Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3),
- iii) se conecta la cámara al intercambiador externo de calor,

- iv) se verifica que el sistema limitador de turbulencias esté correctamente ubicado y se recircula la solución tampón hasta que se alcance la temperatura deseada en la cámara,
- v) se detiene temporalmente la recirculación, para la colocación del minigel o de los minigeles restaurándose posteriormente la recirculación del tampón,
- vi) se calcula el tiempo de electroforesis que separará a las moléculas de ADN,
- vii) se energiza el sistema y se realiza la electroforesis de las moléculas de ADN sobre el gel de caras planas, llevando a cabo la recirculación de la solución tampón a alto flujo.

10

39.- Método de empleo de acuerdo con las reivindicaciones No. 34 y 38 caracterizado porque al ser llenadas las cámaras con solución tampón para realizar la electroforesis, si las cámaras son de tipo CHEF necesitan que la altura del tampón sea al menos 0,3 cm mayor que el grosor del gel, lo que se logra con volúmenes que dependen de la separación 'd' entre los electrodos de polaridades opuestas según la fórmula $\{[2 + (d / \cos(30^\circ))]\} \cdot [6 + d]\} \cdot (0,3 + \text{grosor del gel})$, estando esos valores comprendidos entre 72,3 y 323,3 ml de solución tampón para geles de 0,35 y 0,5 cm de grosor respectivamente.

20

40.- Método de empleo de acuerdo con las reivindicaciones No. 34 y 38 caracterizado porque al ser llenadas las cámaras con solución tampón para realizar la electroforesis, si las cámaras son de tipo TAFE necesitan que la altura del tampón sea al menos 0,3 cm por encima del gel, lo que se logra con volúmenes que dependen de la separación 'd' entre los electrodos de polaridades opuestas y del número de ZUE activas ('NZUEactivas') en la cámara y se calculan según la fórmula $[(2+1,4 \cdot d) \cdot (2+0,54 \cdot d) - 1,02 \cdot (1+0,54 \cdot d)^2] \cdot L \cdot \text{NZUE}_{\text{activas}} / \text{NZUE}_{\text{total}}$, estando esos valores comprendidos entre 63,2 y 7390 ml.

25

41.- Método de empleo de acuerdo con las reivindicaciones No. 34 y 38 caracterizado porque en las cámaras CHEF y TAFE, que poseen activadas una ZUE única, se pueden aplicar campos eléctricos de hasta 16 y 25 V/cm respectivamente, empleando fuentes de poder cuya salida de potencia máxima puede ser menor de 300 watt, siempre que el

30

tampón se equilibre a una temperatura constante que puede estar en el rango de 4 a 30°C.

42.- Método de empleo de acuerdo con las reivindicaciones No. 34, 37 y 38 caracterizado porque en las cámaras TAFE, en las que se activan dos o más ZUE, se pueden aplicar campos eléctricos máximos entre 8 y 25 V/cm en dependencia del número de ZUE activadas, siempre que el tampón se equilibre a una temperatura constante que puede estar en el rango de 4 a 30°C.

43.- Método de empleo de acuerdo con las reivindicaciones No. 34 y 38 caracterizado porque el tiempo de electroforesis en los equipos CHEF se calcula según la fórmula $[(D/m) \cdot 2 \cdot t_p]$, conociendo la distancia 'm' que migra una molécula lineal de ADN en cada pulso de duración 'tp', a partir de suministrarle el valor de la distancia 'D' en centímetros que se desea que la molécula más pequeña migre en el gel, donde el valor preferente de 'D' es la distancia entre el origen de migración y el borde inferior del gel menos 0,1 ó 0,2 cm, tamaño de gel que se calcula a partir de la distancia 'd' entre electrodos de polaridad opuesta y donde los tiempos de electroforesis empleados para separar moléculas de ADN de hasta 2 Mb en agarosa al 1,5 % y con tampón TBE 0,5X a 30°C están comprendidos entre 1,5 horas y 9 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente, mientras que si el tampón se utiliza a 10°C ellos están entre 2,5 y 14,5 horas para 16 y 5,8 V/cm, respectivamente.

44.- Método de empleo de acuerdo con la reivindicación No. 34 caracterizado porque para tensar adicionalmente los electrodos en las cámaras de tipo TAFE es necesario llevar a cabo los siguientes pasos:

- i) aflojar el prisionero que inmoviliza al vástago en el cual está insertado el electrodo,
- ii) hacer girar el vástago el ángulo requerido para que queden tensos dichos electrodos,
- iii) apretar el prisionero para inmovilizar al vástago en su posición final y mantener tenso el electrodo.

10/07/0078

1/18

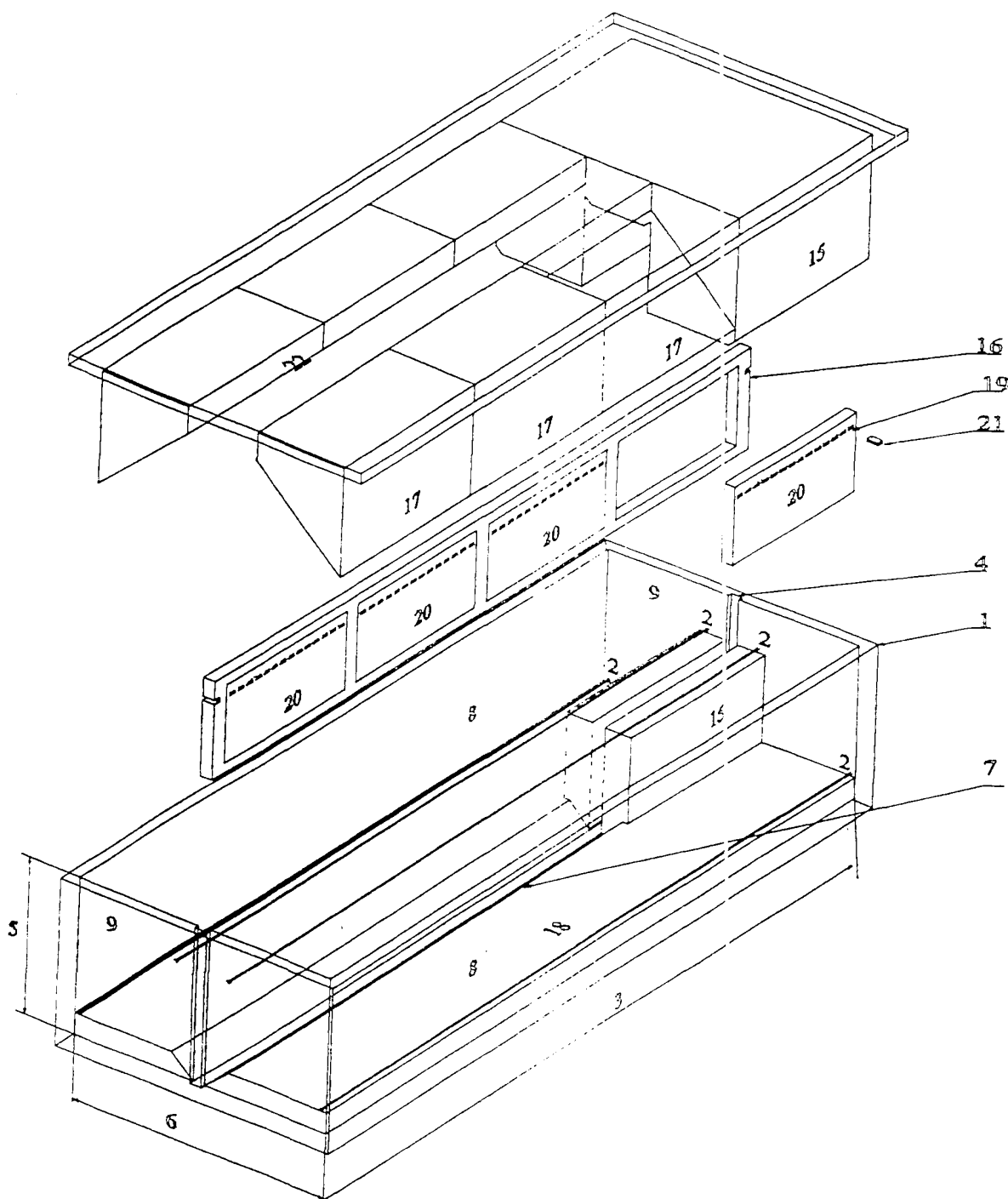


Fig.1

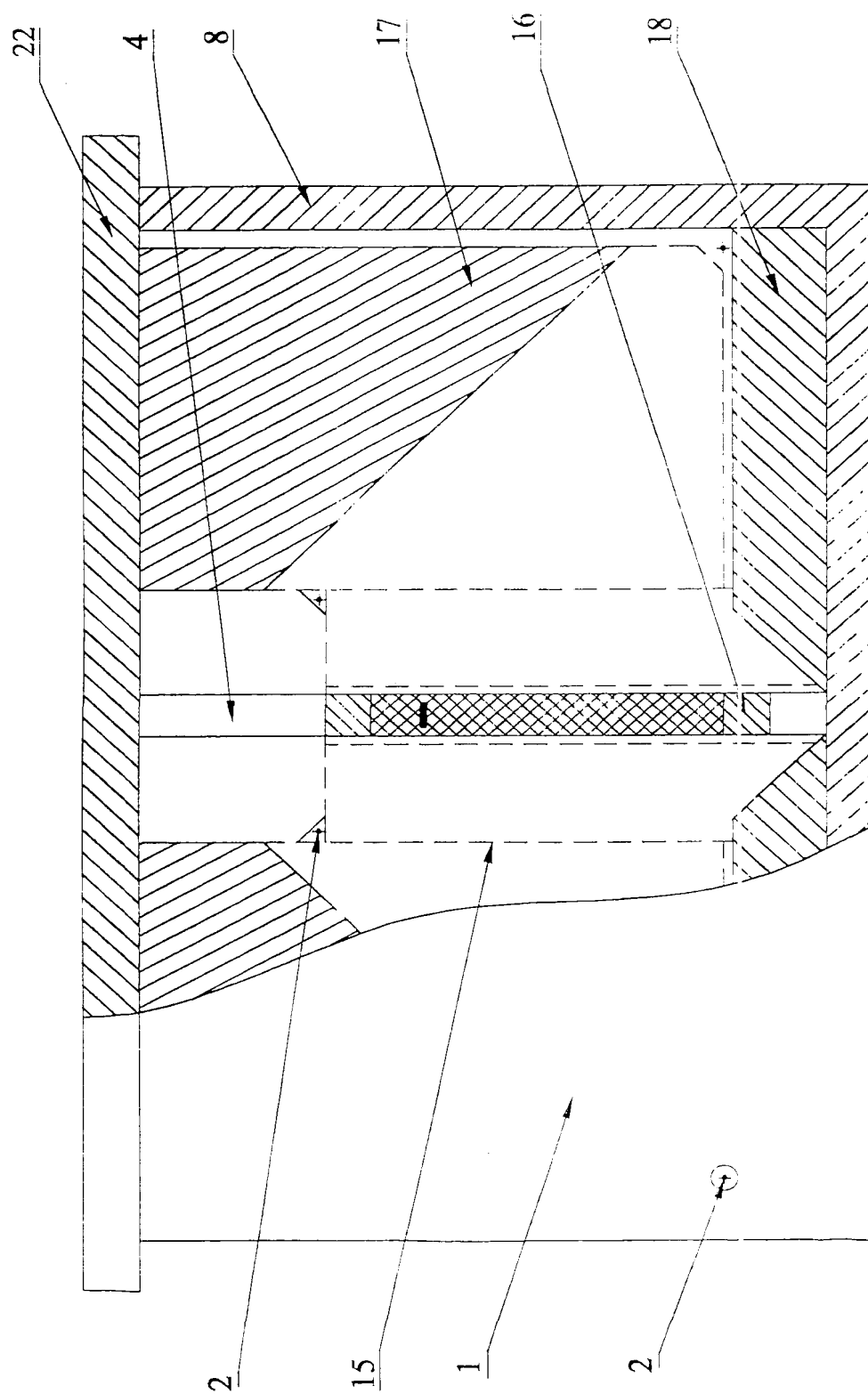


Fig. 2

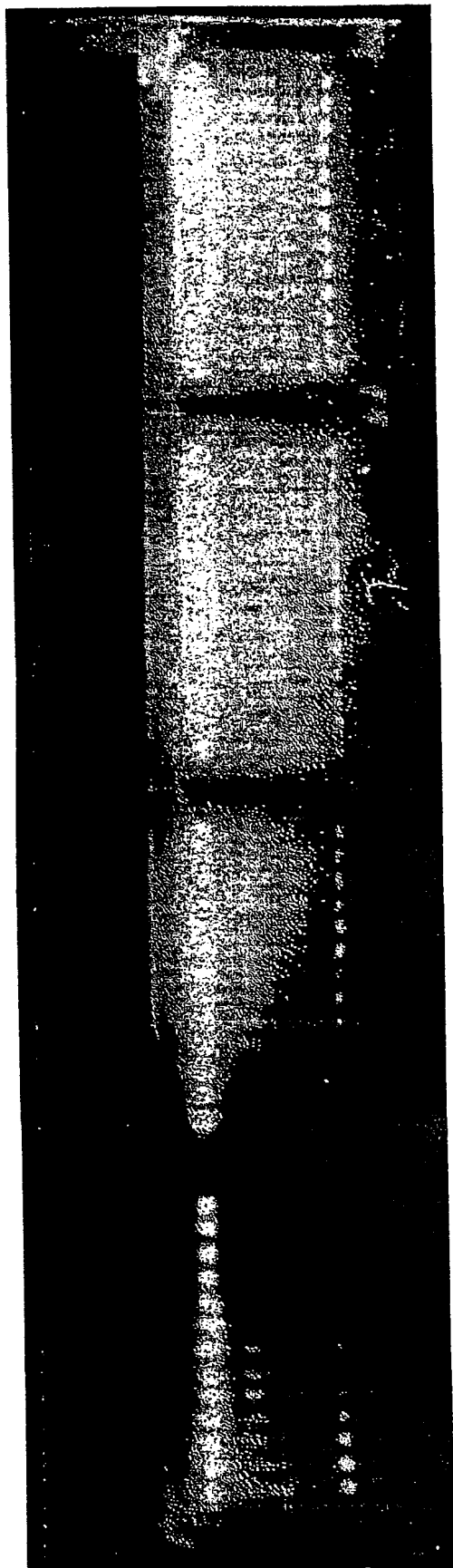


Fig. 3

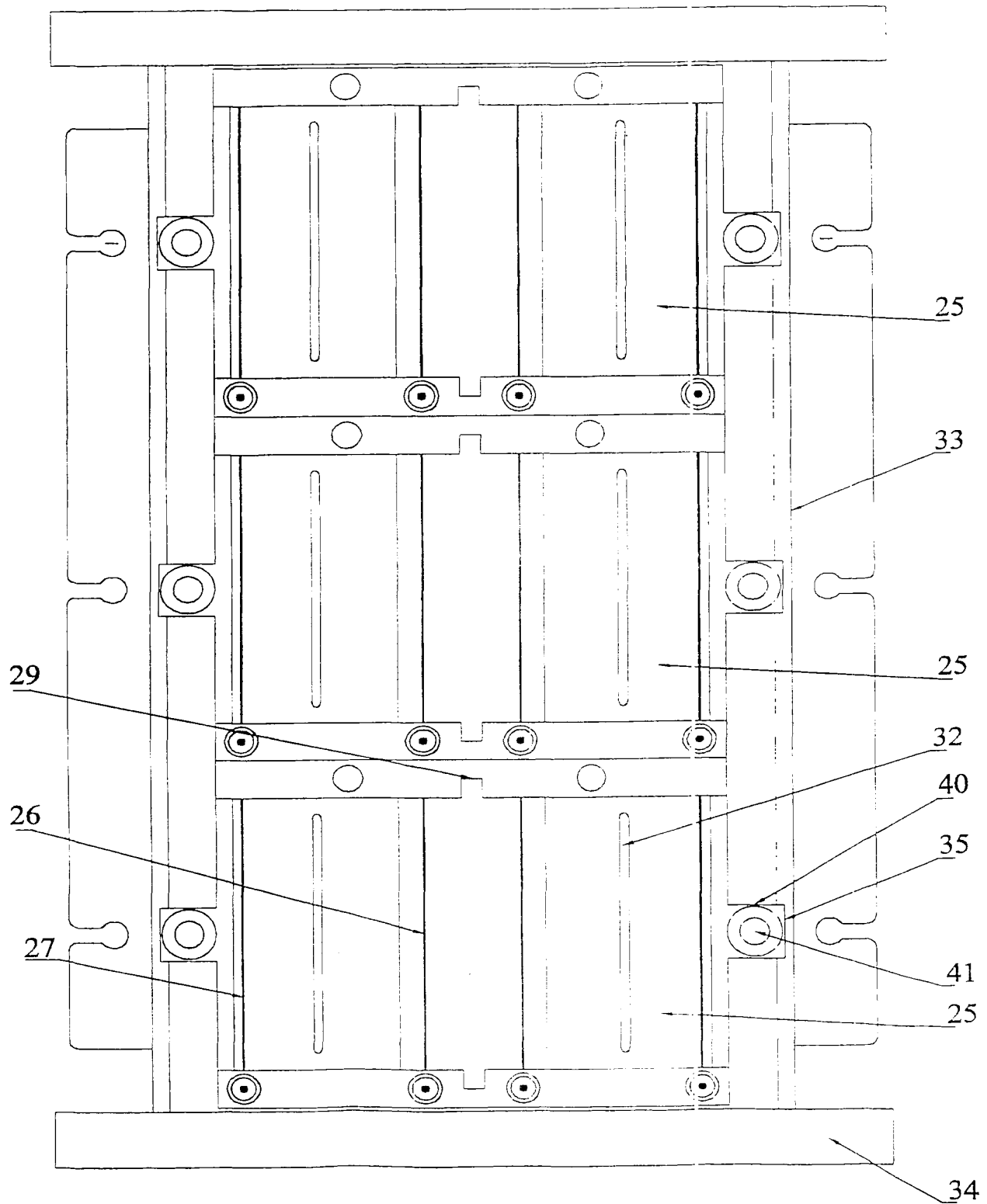


Fig. 5

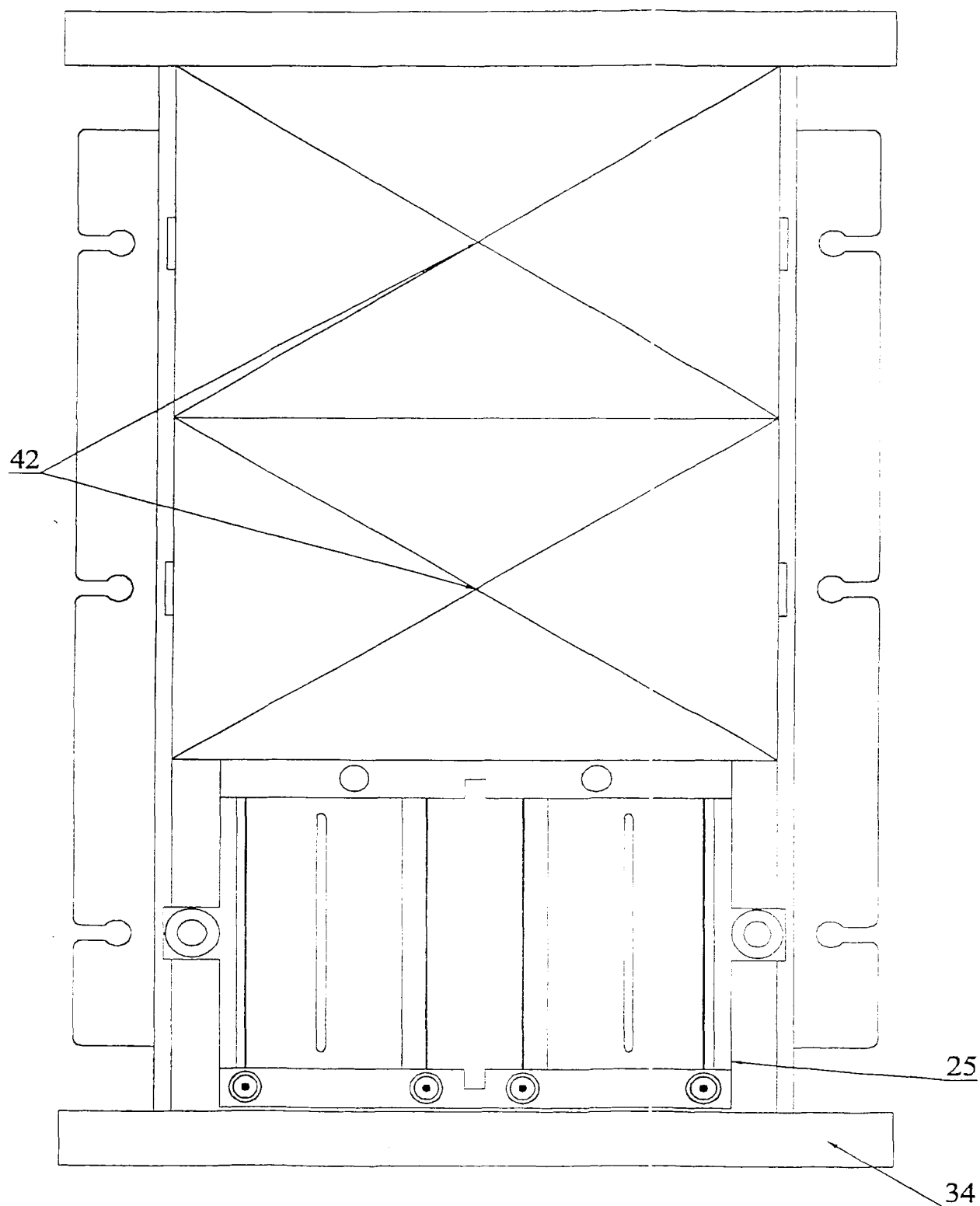


Fig. 6

10/000003

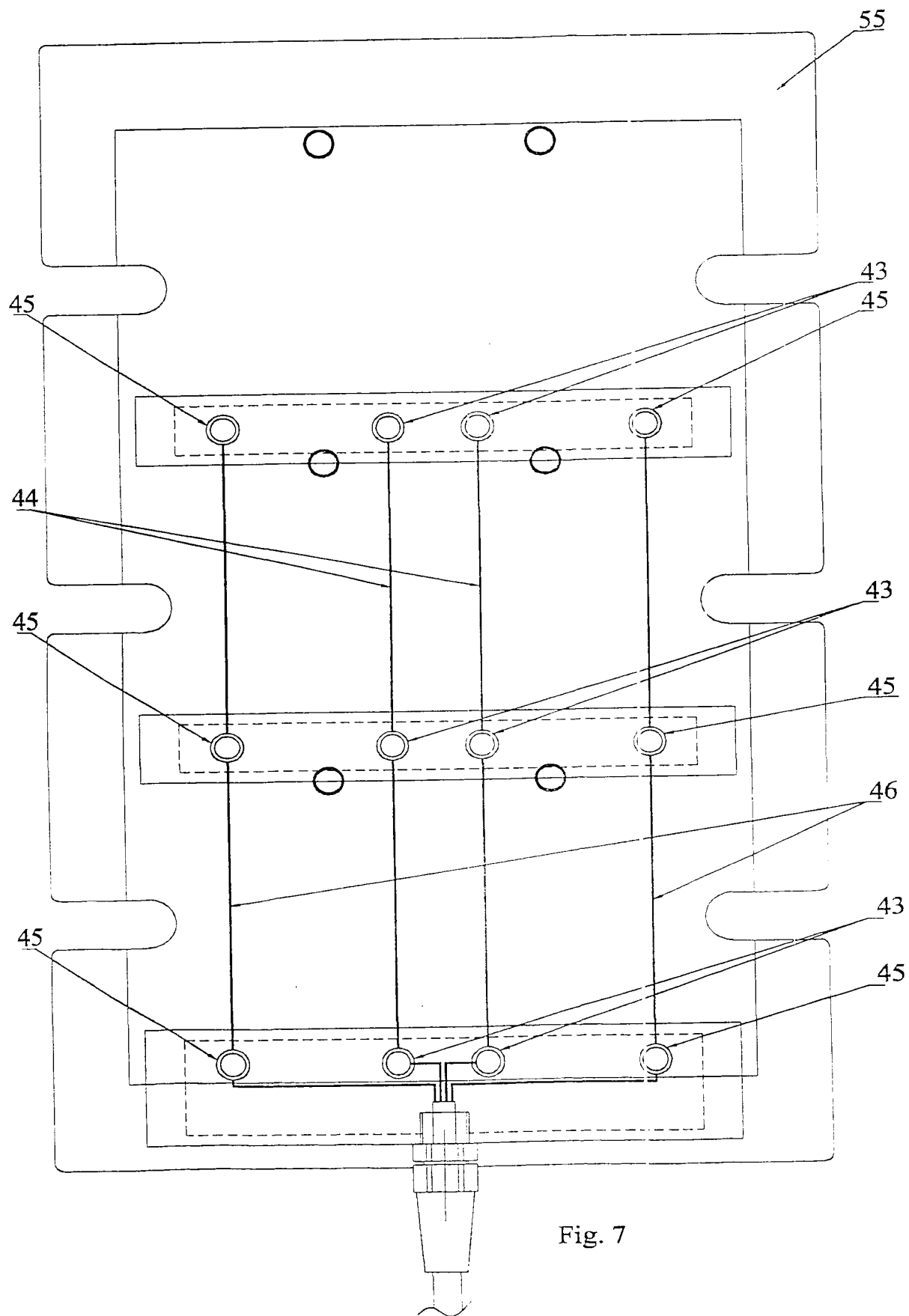


Fig. 7

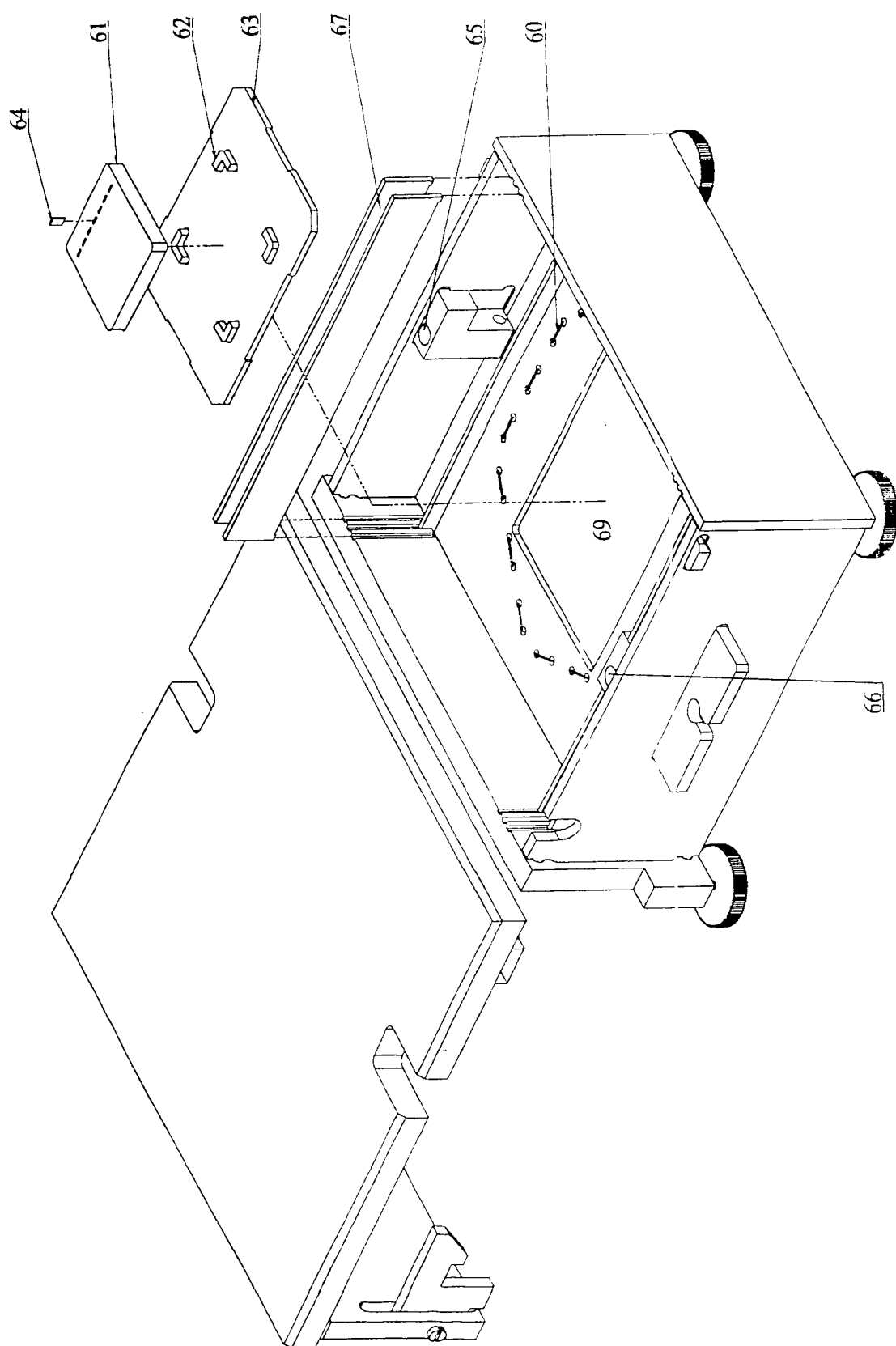


Fig. 8

10/070378

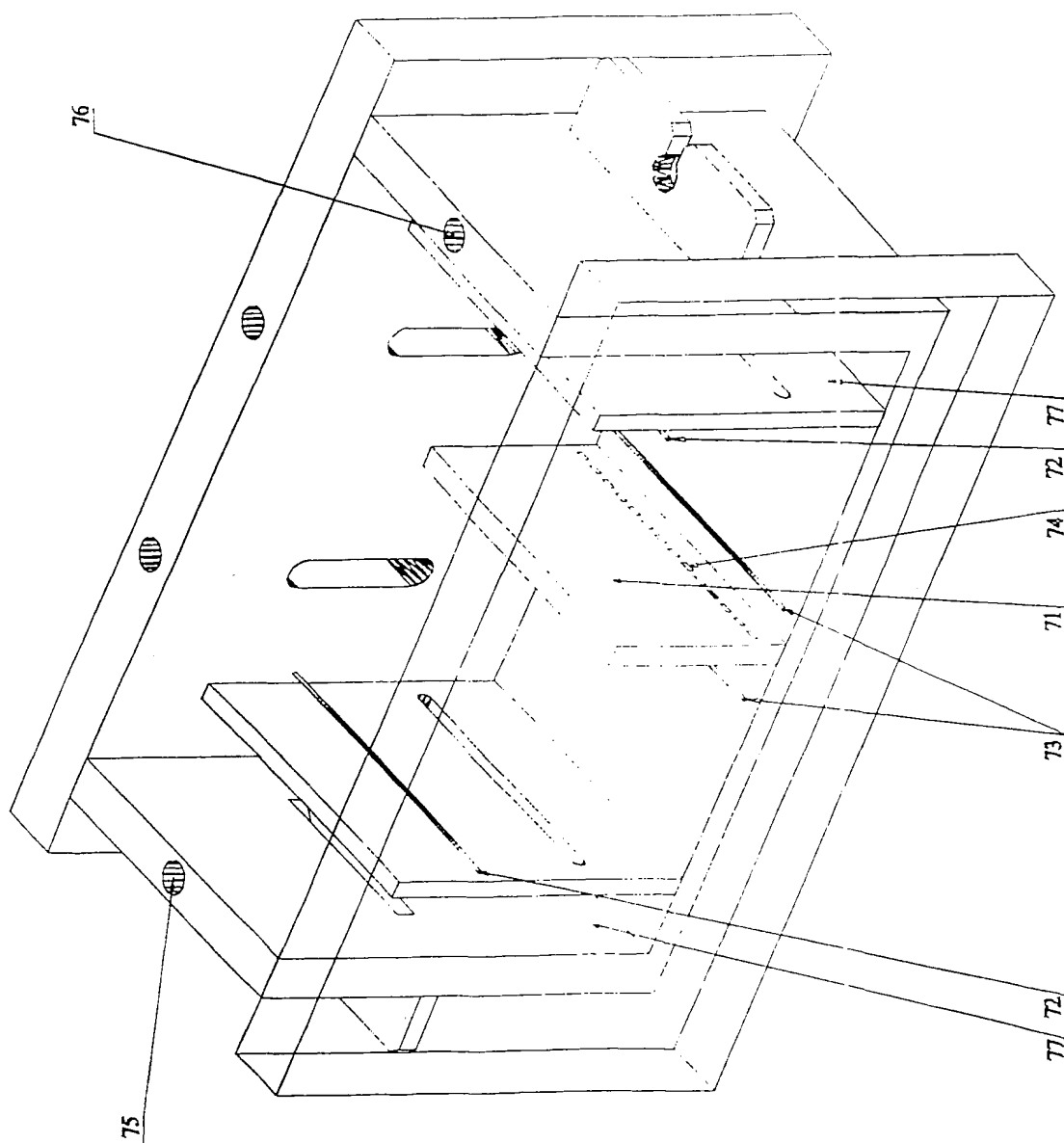


Fig. 9

10/18

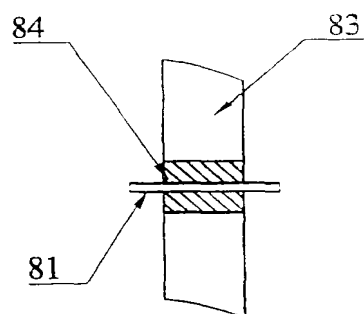
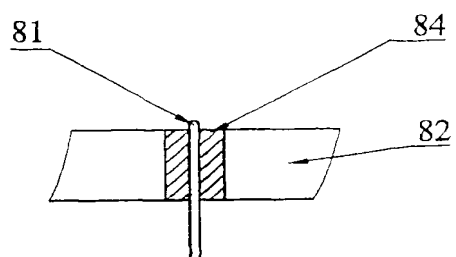


Fig. 10

10/070878

11/18

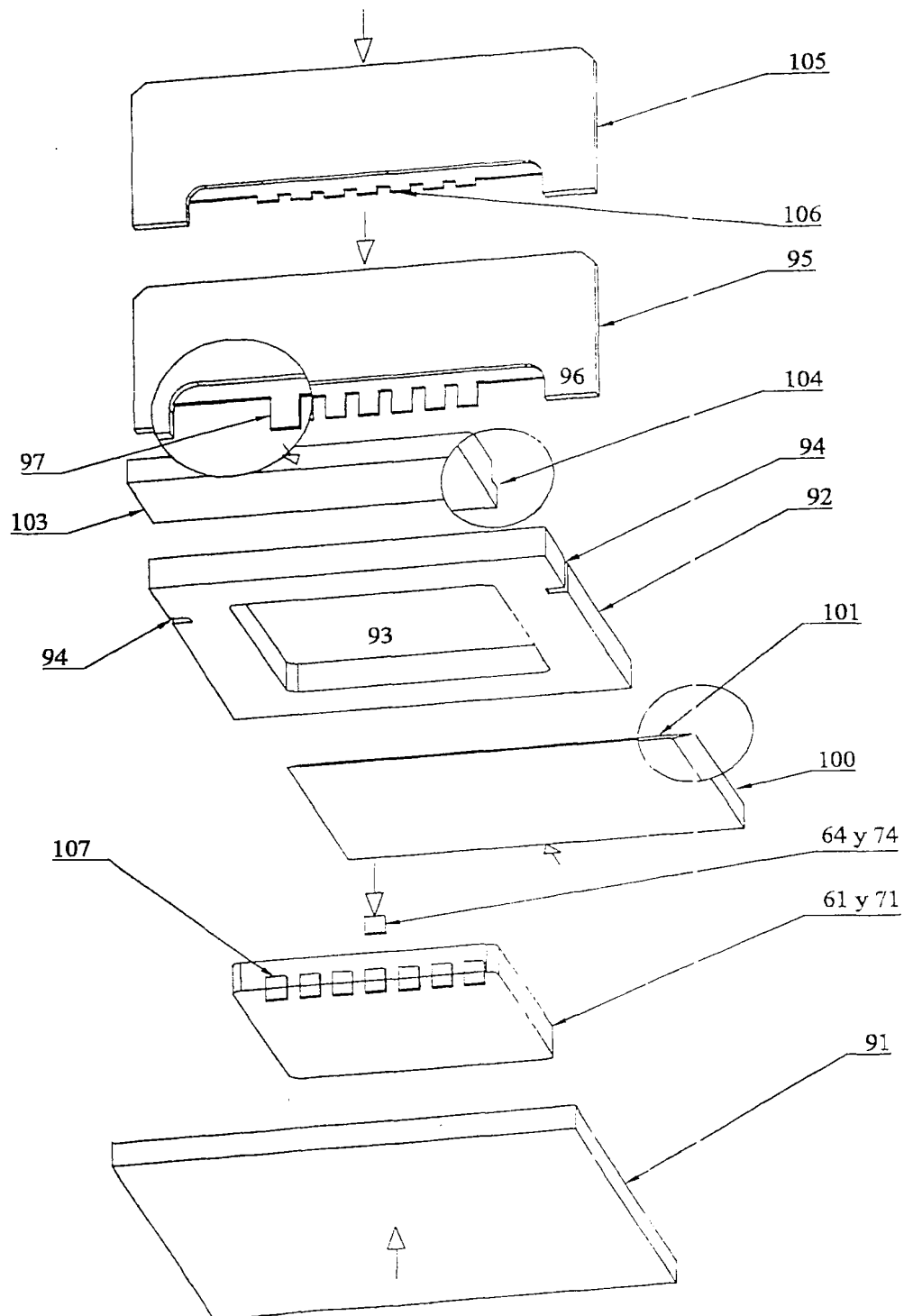


Fig. 11

12/18

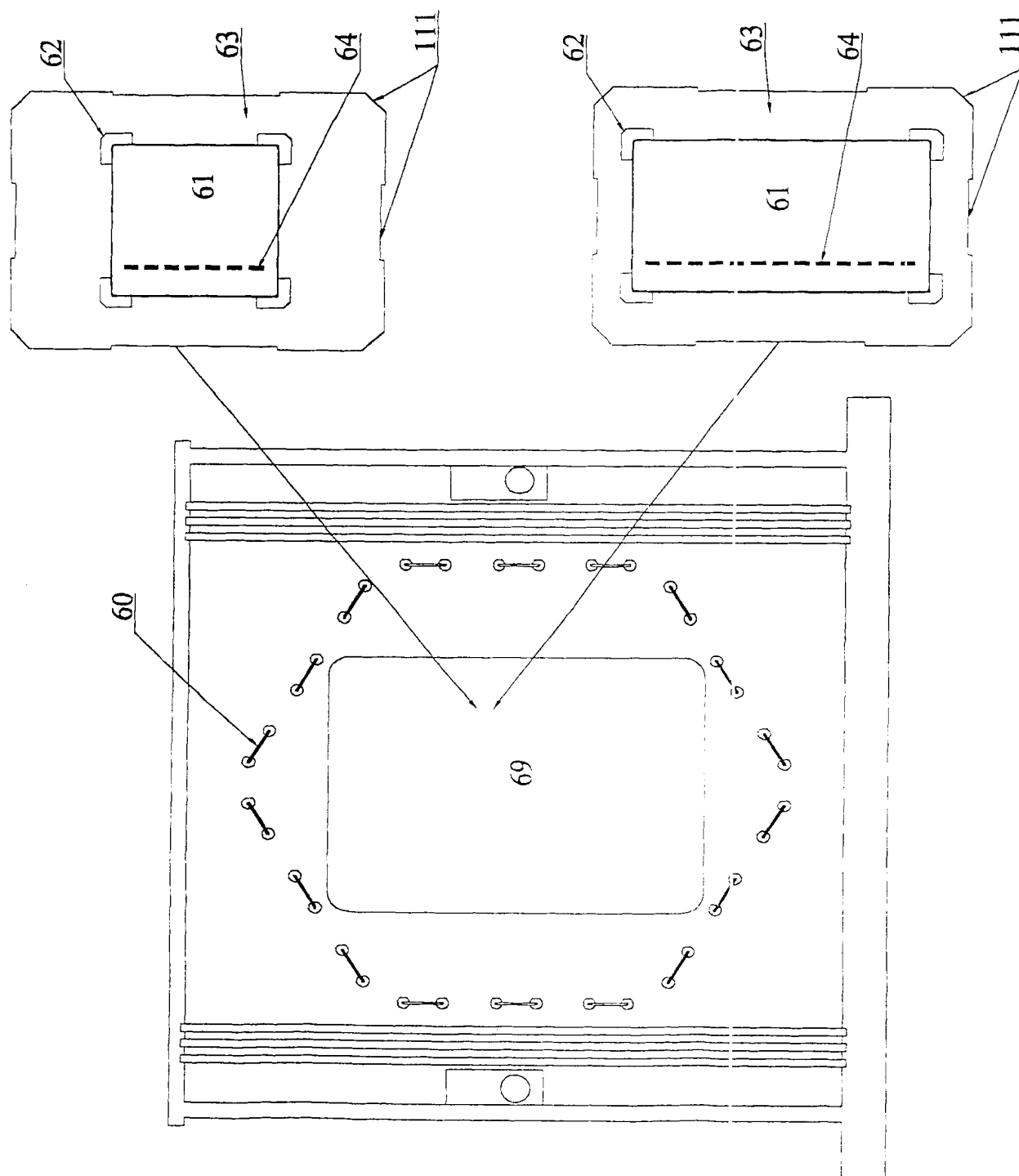


Fig. 12

13/18

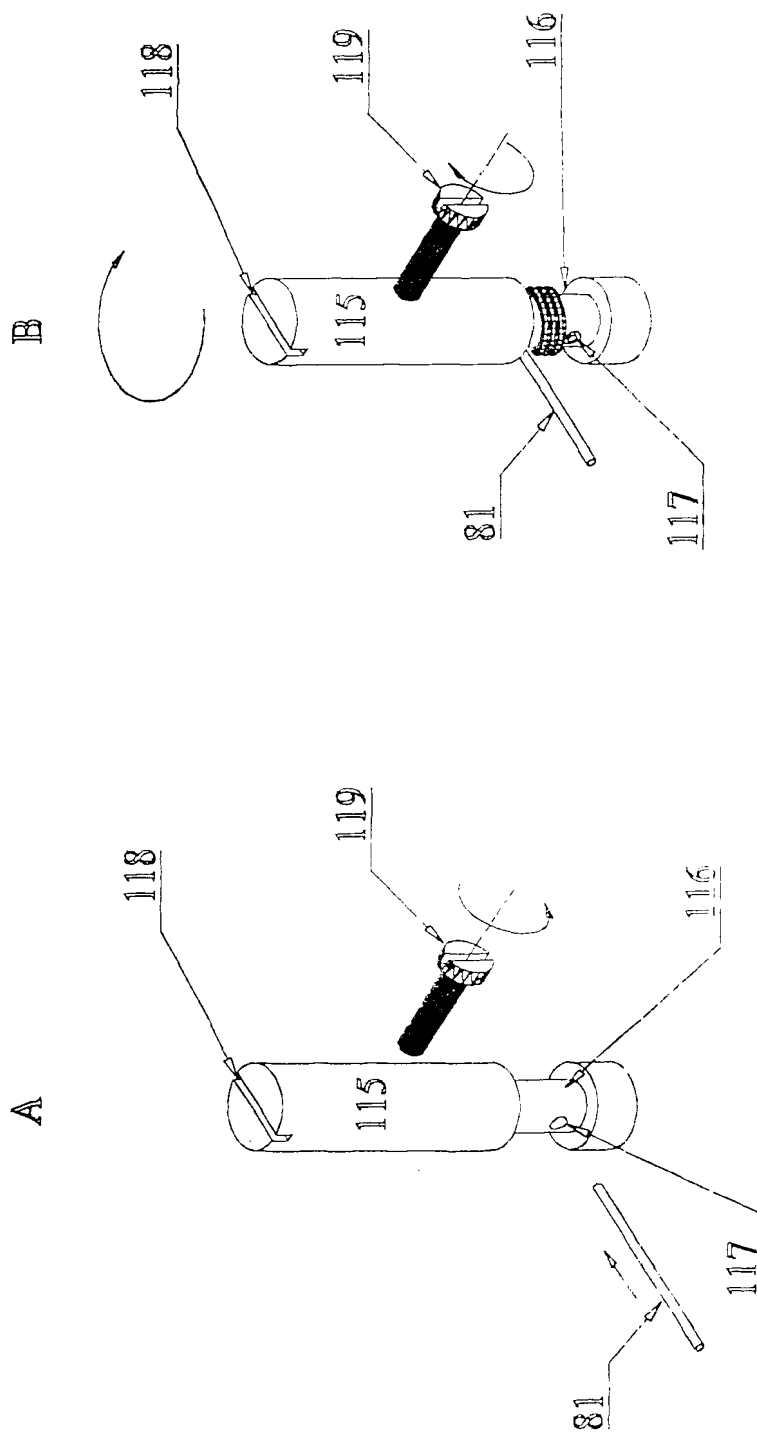


Fig. 13

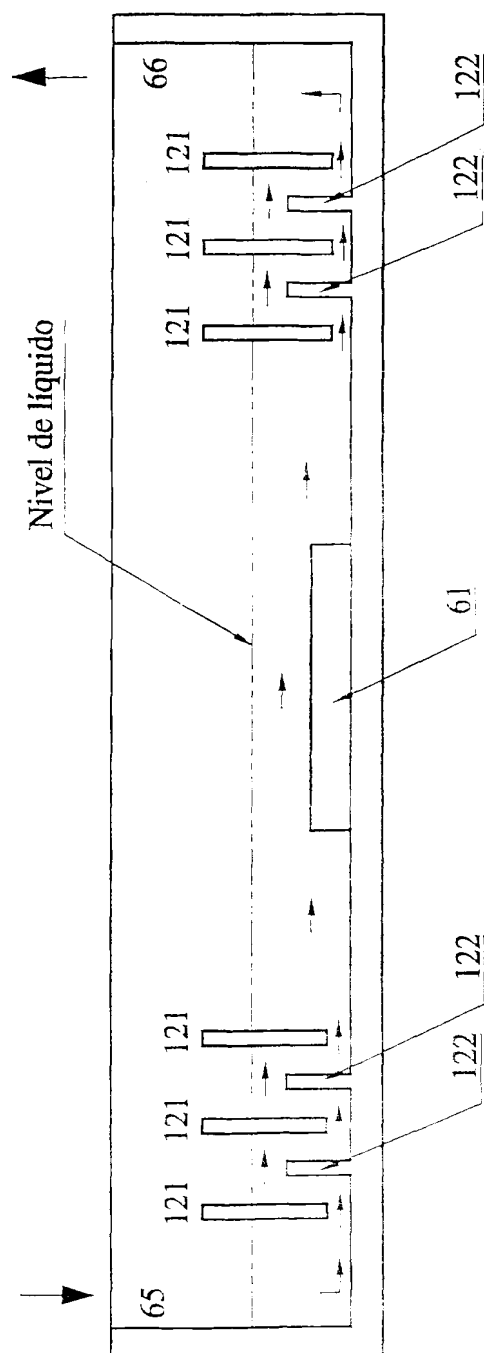


Fig. 14

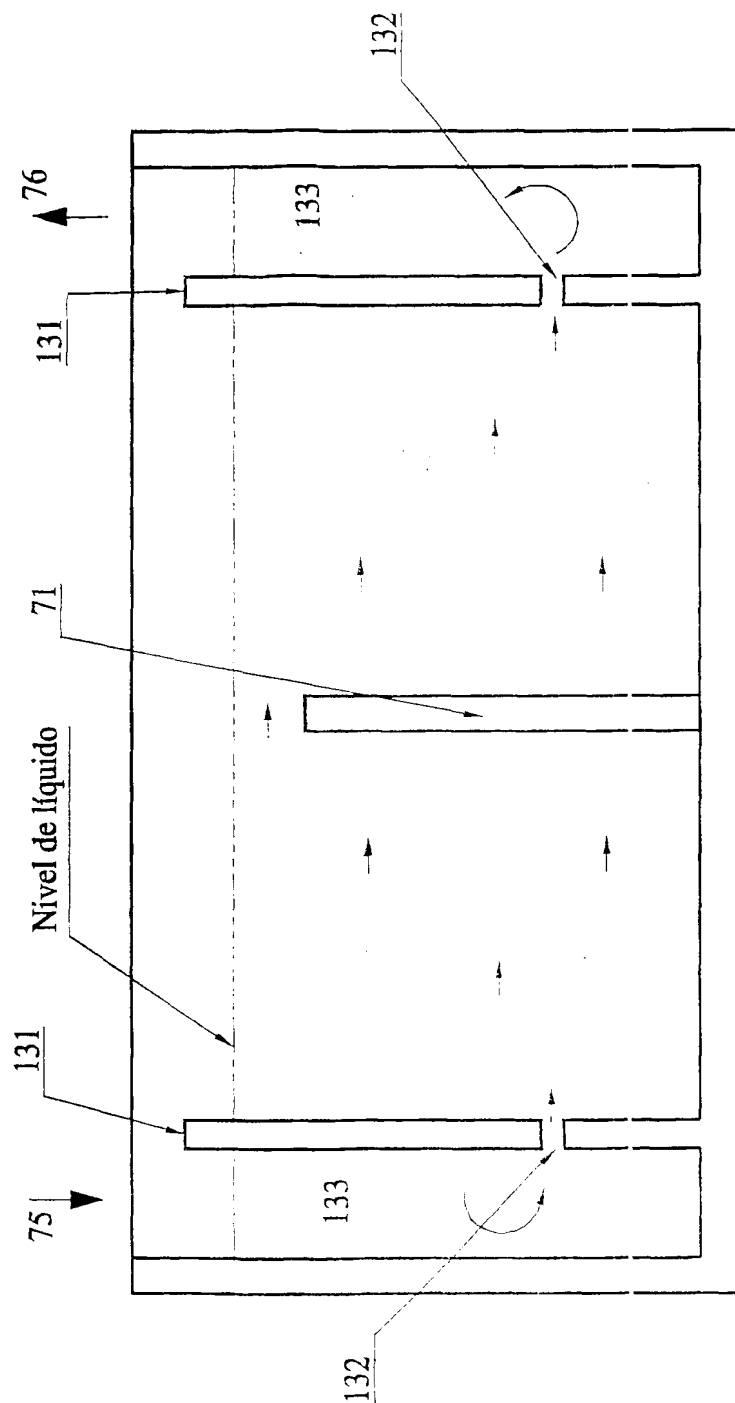


Fig. 15

10/070878

16/18

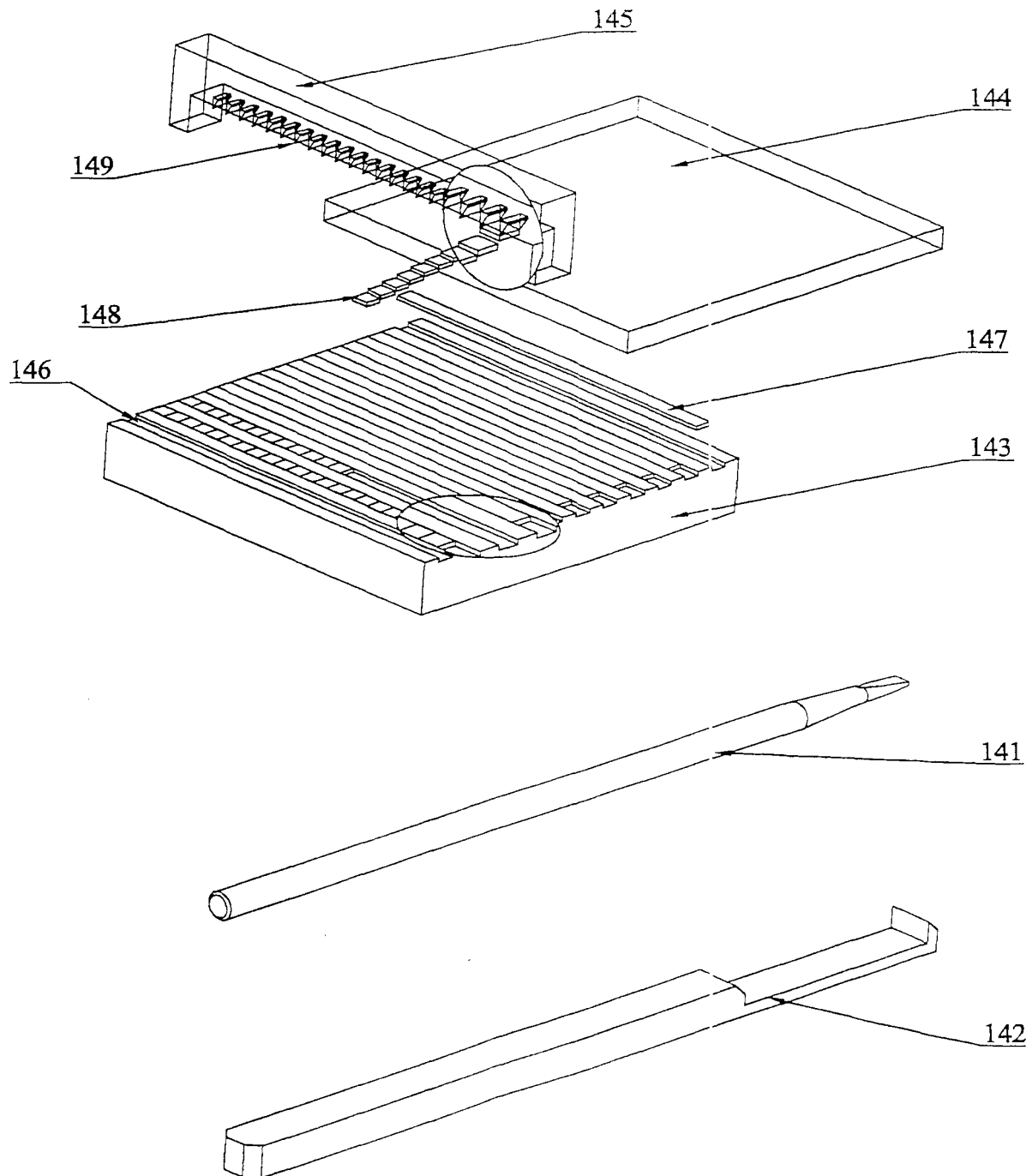


Fig. 16

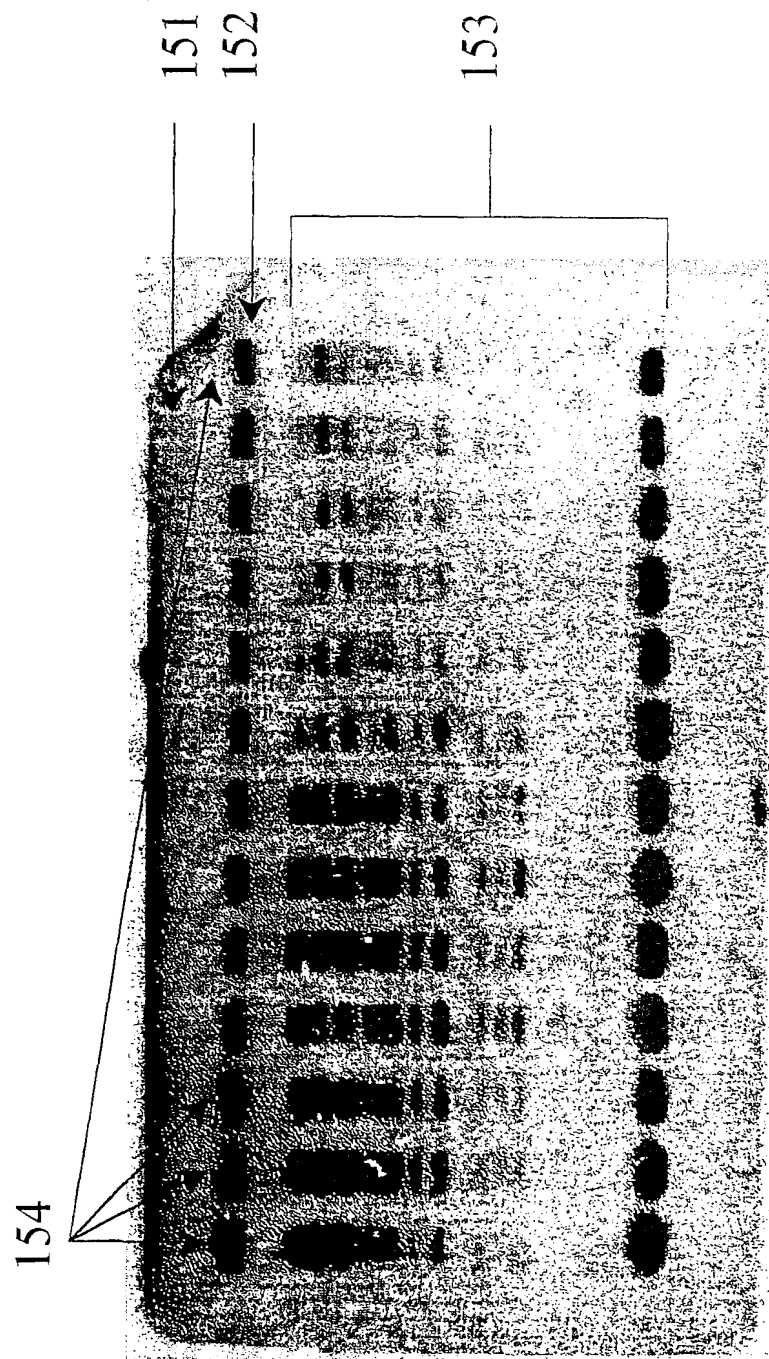


Fig. 17

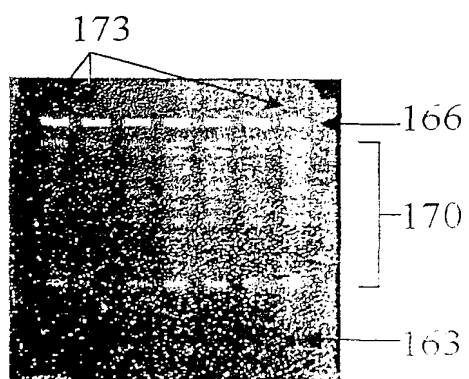
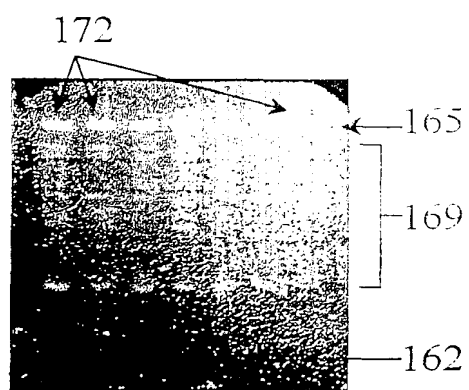
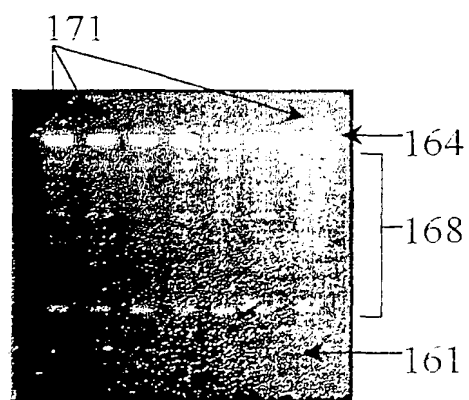


Fig. 18